

ROLLE DES CFHR5 PROTEINS BEI DER PATHOGENESE DER C3- GLOMERULOPATHIE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Ulrike Senftleben

geboren am 29. Oktober 1991 in Torgau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter F. Zipfel,
Abteilung Infektionsbiologie, Hans-Knöll-Institut Jena
2. Prof. Dr. med. Thomas Kamradt,
Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Michael Wiesener,
Abteilung Nephrologie und Hypertensiologie, Universitätsklinikum Erlangen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07. März 2017

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	I
2	Abkürzungsverzeichnis	IV
3	Zusammenfassung.....	V
4	Einleitung	1
4.1	Die C3- Glomerulopathie	1
4.2	Das Komplementsystem	1
4.3	Der Alternativer Weg der Komplementaktivierung	2
4.4	Die CFHR- Familie	4
4.5	CFHR- Hybridproteine	6
4.6	CFHR5.....	8
5	Ziele der Arbeit	11
6	Material und Methoden	12
6.1	Ortsgerichtete Mutagenese, Proteinexpression und Aufreinigung	12
6.1.1	Ortsgerichtete Mutagenese zur Generierung des CFHR5 Mittelfragments	12
6.1.2	HEK- Zellsystem zur Expression der rekombinanten Proteine	13
6.1.3	Aufreinigung der Proteine mittels Nickel- Chelatchromatographie	13
6.2	Antikörpertestung im ELISA.....	14
6.3	Zellbindungsanalyse der rekombinanten Proteine CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten	15
6.3.1	Untersuchung der Proteinbinding an CHO-Zellen.....	15
6.3.2	Analyse der Bindung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC.....	16
6.3.2.1	Produktion intakter, früh- und spätapoptotischer sowie nekrotischer HUVEC.....	16
6.3.2.2	Bindungsnachweis durch Western Blot	17
6.3.2.3	Durchflusszytometrische Bindungsanalyse	18

6.3.2.4	Untersuchung der Proteinbindung im konfokalen Laser Scanning Mikroskop	19
6.4	Untersuchung der Heparinbindung mittels ELISA	20
6.5	Untersuchung der Bindung an C3- Moleküle und Properdin mittels ELISA	20
7	Ergebnisse	22
7.1	CFHR5 und die CFHR5- Deletionsmutanten.....	22
7.2	Herstellung des CFHR5 Mittelfragments mittels gerichteter Mutagenese.....	22
7.3	Detektion von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten mittels immunologischen Nachweises	23
7.4	Detektion von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten im Silbergel und Western Blot	24
7.5	CFHR5 bindet an Zellen.....	27
7.5.1	CFHR5 bindet an CHO- Zellen.....	27
7.5.2	CFHR5 bindet an HUVEC	27
7.6	CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische humane Zellen.....	28
7.6.1	Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC mittels Western Blot.....	29
7.6.2	Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC mittels Durchflusszytometrie.....	30
7.6.3	Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC mittels Fluoreszenzmikroskopie	31
7.7	Lokalisation der Oberflächenbindedomäne von CFHR5	32
7.7.1	Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an CHO Zellen	32
7.7.2	Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC	34
7.7.2.1	Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte und modifizierte HUVEC, Nachweis mittels Western Blot	34
7.7.2.2	Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte und modifizierte HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie.....	35

7.7.2.3	Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie	38
7.8	Heparin, ein Ligand für CFHR5	39
7.9	CFHR5 bindet C3- Aktivierungsfragmente.....	40
7.9.1	Bindung von CFHR5 an C3- Aktivierungsfragmente.....	40
7.9.2	Lokalisation der Bindedomäne von CFHR5 für C3- Aktivierungsfragmente ...	41
7.10	CFHR5 bindet an Properdin	43
7.10.1	Bindung von CFHR5 an Properdin	43
7.10.2	Lokalisation der Properdin- Bindungsdomäne von CFHR5	44
8	Diskussion	45
9	Ausblick	57
10	Schlussfolgerungen	60
11	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	61
12	Anhang	66
12.1	Ehrenwörtliche Erklärung.....	66
12.2	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	67
12.2.1	Abbildungsverzeichnis	67
12.2.2	Tabellenverzeichnis.....	68
12.3	Danksagung	69

2 Abkürzungsverzeichnis

BGH	<i>bovine growth hormone</i> (Bovines Wachstumshormon)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppe)
CFHR	<i>complement factor H-related protein</i> (Komplement Faktor H-verwandtes Protein)
CHO	<i>chinese hamster ovary</i> (Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters)
CMV	Cytomegalievirus
CR	<i>complement receptor</i> (Komplement- Rezeptor)
DAF (CD55)	<i>decay acceleration factor</i> (Zerfallsbeschleunigender Faktor)
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (D. Phosphatgepufferte Salzlösung)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FH	Faktor H
FHL 1	<i>factor H like protein 1</i> (Faktor H- ähnliches Protein 1)
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fetales Kälberserum)
HEK	<i>human embryonic kidney</i> (menschliche embryonale Nierenzellen)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Nabelschnurendothelzellen)
kDa	Kilodalton
mAk	Monoklonaler Antikörper
MCP (CD46)	<i>membrane cofactor protein</i> (Membran- Kofaktor Protein)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
µg/µl	Mikrogramm (10^{-6} g)/ Mikroliter (10^{-6} l)
mg/ml	Milligramm (10^{-3} g)/ Milliliter (10^{-3} l)
ng/nm	Nanogramm (10^{-9} g)/ Nanometer (10^{-9} m)
NK- Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SCR	<i>short consensus repeat</i> , SCRs entsprechen Struktureinheiten
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)

3 Zusammenfassung

Die C3- Glomerulopathie ist eine seltene und schwerwiegende Nierenerkrankung mit definierten C3- Komplementablagerungen im Bereich der Glomerulären Basalmembran der Niere. Aktuell gibt es keine kausale Therapie. Aufgrund des veränderten C3- Spiegels im Blut der Patienten wird postuliert, dass die C3- Glomerulopathie durch eine Deregulation des Komplementsystems hervorgerufen wird. Sowohl Autoantikörper, die sich gegen Komplementproteine richten, wie auch Veränderungen in den Genen der Komplementproteine sind mit dieser Krankheit assoziiert. Eine wichtige genetische Ursache für die Entwicklung der C3- Glomerulopathie ist die Expression von CFHR5- Hybridproteinen.

Um die Rolle von CFHR5- Hybridproteinen bei der Pathogenese der C3- Glomerulopathie zu untersuchen, wurden das CFHR5 Protein, sowie CFHR5 Deletionsmutanten generiert, exprimiert und funktionell charakterisiert. Das Ziel war die Ligandeninteraktions- und Oberflächenbindungsdomänen von CFHR5 zu lokalisieren. Es wurde getestet, ob CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten mit Heparin, Properdin und C3- Aktivierungsfragmenten interagieren und ob CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten an intakte und modifizierte, i.e. apoptotische und nekrotische humane Zellen binden.

CFHR5 interagiert mit Heparin, Properdin und den C3- Aktivierungsfragmenten C3b, iC3b, C3c und C3d. Die Mittelregion von CFHR5 repräsentiert die Interaktionsdomäne für diese Liganden. CFHR5 bindet an intakte und mit höchster Intensität an modifizierte humane Endothelzellen. Auch die Oberflächenbinderegion von CFHR5 ist in der Mittelregion lokalisiert. Im Weiteren wurde eine neue, zweite Dimerisierungsdomäne im C- Terminus von CFHR5 identifiziert.

CFHR5 bindet an C3d und kann so die adaptive Immunantwort modulieren. Die funktionellen Untersuchungen deuten darauf hin, dass CFHR5 den Alternativen Weg des Komplementsystems über die Interaktion mit Properdin und C3b auf modifizierten körpereigenen Zelloberflächen aktiviert, und so die nicht- inflammatorische Beseitigung der veränderten körpereigenen Partikel durch Phagozytose gewährleistet. Die CFHR5- Hybridproteine deregulieren das Komplementsystem, indem sie die Komplementaktivierung verstärken und können so zur Schädigung der Glomerulären Basalmembran und des Mesangiums führen.

Bis die zielgerichtete Hemmung der C3- Konvertase als Therapie der C3- Glomerulopathie zur Verfügung steht, sollte eine Komplementmodulation mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Eculizumab versucht werden, um so die Schädigung der Glomerulären Basalmembran und des Mesangiums zu blockieren.

4 Einleitung

„Man ist also [...] gezwungen, [...] zwei Substanzen anzunehmen, eine spezifisch wirksame, widerstandsfähige, die wir in Anschluss an Pfeiffer im Folgenden kurz Immunkörper nennen wollen, und eine normal vorhandene, höchste labile Substanz, der wir vorläufig den in nichts vorgreifenden Namen „Addiment“ geben wollen.“

Paul Ehrlich, 1899 in „Berliner klinische Wochenschrift“

4.1 Die C3- Glomerulopathie

Die C3- Glomerulopathie ist eine seltene und schwerwiegende Nierenerkrankung. In erster Linie erkranken Kinder und junge Erwachsene und zeigen klinisch ein nephrotisches oder nephritisches Syndrom, aber auch asymptomatische Verläufe sind möglich (Appel et al. 2005). Der Krankheitsverlauf ist durch fortschreitende Einschränkung der glomerulären Funktion gekennzeichnet und führt häufig zum terminalen Nierenversagen. Bisher gibt es keine effektive Therapie der Erkrankung (Alchi und Jayne 2010, Xiao et al. 2014, Mathur et al. 2015). Die C3- Glomerulopathie zeigt immunhistologisch definierte C3- Komplementablagerungen im Mesangium und im Bereich der Glomerulären Basalmembran der Niere (Sethi et al. 2012, Cook und Pickering 2015). Sowohl Autoantikörper, die sich gegen Komplementproteine richten, wie auch Mutationen in Komplementgenen und veränderte Genkopienzahlen im CFHR- Genloкус sind mit dieser Krankheit assoziiert (Licht et al. 2007, Zipfel et al. 2015). Auch der C3- Spiegel im Blut betroffener Patienten ist verändert und deshalb wird postuliert, dass die C3- Glomerulopathie durch eine Deregulation des Komplementsystems, dem erstmals von Paul Ehrlich 1899 beschriebenen „Addiment“, hervorgerufen wird (Ehrlich und Morgenroth 1899, Pickering et al. 2013, Servais et al. 2013, Barbour et al. 2014).

4.2 Das Komplementsystem

Heute ist bekannt, dass das Komplementsystem weit mehr als ein „Addiment“ ist, es ist als einer der ältesten Ecksteine der Immunität ein zentrales Element für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Das Komplementsystem ist ein zentraler Teil unseres angeborenen Immunsystems und eine der ersten und wichtigsten Instanzen der Immunabwehr (Sunyer et al. 1998, Gasque 2004). Es steuert die angeborene Immunantwort und moduliert die adaptive

Immunität. Das Komplementsystem initiiert einerseits Entzündungsreaktionen und Immunaktivierung, die zur Beseitigung von Mikroorganismen führt. Auf der anderen Seite sorgt es für eine nichtentzündliche Beseitigung von apoptotischen Zellen sowie Zelldebris und schützt so vor autoreaktiven Immunantworten (Flierman und Daha 2007). Für die Immunhomöostase ist das Komplementsystem von herausragender Bedeutung und unterliegt genauesten Kontrollen. Die strenge Regulation dieses komplexen Systems wird deutlich, wenn bei Defekten von einzelnen Komponenten der Komplementkaskade die Balance zwischen Immunabwehr und Schutz eigenen Gewebes gestört ist. Das entstandene Ungleichgewicht führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen oder auch zu einer Schädigung von körpereigenen Strukturen bzw. zur fehlerhaften Eliminierung von veränderten körpereigenen Partikeln (Trouw et al. 2008, Ricklin et al. 2010, Merle et al. 2015b).

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 100 im Blut zirkulierenden Proteinen und Aktivierungsfragmenten, welche durch Proteolyse kaskadenartig aktiviert werden. Die Initiierung des Klassischen Weges und des Lektin Weges erfolgt durch Antikörper bzw. Mannose- bindende Lektingruppen. Dahingegen ist der Alternative Weg spontan und kontinuierlich aktiv. Die Deregulierung und Überaktivität des Alternativen Weges der Komplementkaskade nimmt eine zentrale Position in der Pathogenese der C3- Glomerulopathie ein (Zipfel et al. 2006).

4.3 Der Alternativer Weg der Komplementaktivierung

Der Alternative Weg wird ständig und spontan aktiviert (Abb. 1A). Das im Blut zirkulierende C3 hydrolysiert spontan zu C3(H₂O) und das nun aktivierte C3(H₂O) bindet Faktor B, welcher daraufhin von der Protease Faktor D in Ba und Bb gespalten wird. Es wird die C3- Konvertase der Flüssigphase C3(H₂O)Bb gebildet, welche C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b spaltet. C3b bindet, wenn es nicht direkt inaktiviert wird, an benachbarte Oberflächen und kann auf diesem Weg die membrangebundene C3- Konvertase bilden (C3bBb). Diese ist aufgrund ihrer Amplifikationsfunktion in der Lage, schnell große Mengen C3 in C3a und C3b zu spalten und die Oberfläche mit C3b zu opsonisieren. Die auf der Oberfläche entstehenden Komplexe sind die Basis für die Bildung der C5- Konvertase, welche durch freigesetztes C5a zur Inflammation beiträgt. Die C5- Konvertase rekrutiert weitere Komplementproteine (C6, C7, C8, C9), die zur Bildung des Terminalen Komplexes notwendig sind und führt auf diesem Weg zur Zelllyse (Rodriguez de Cordoba et al. 2011, Merle et al. 2015a).

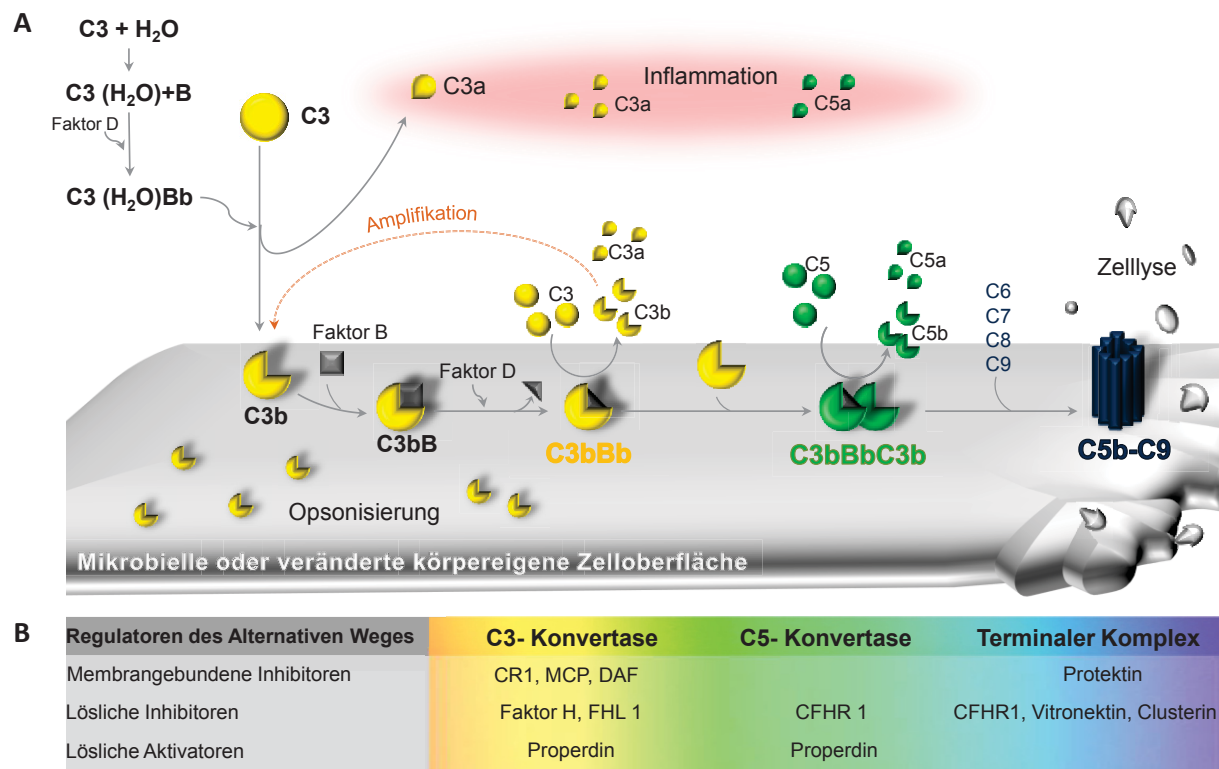


Abb. 1: Der Alternative Weg des Komplementsystems und dessen Regulatoren.

(A) Gezeigt sind die Aktivierung, Amplifikation und Effektorfunktionen des Alternativen Weges. Der Alternative Weg unterliegt einer spontanen und kontinuierlichen Aktivierung und generiert die C3-Konvertase, welche C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b spaltet. Die C5-Konvertase entsteht auf Basis der C3-Konvertase und initiiert den Terminalen Komplex der Komplementaktivierung, welcher zur Zelllyse führt. (B) Die Regulatoren des Alternativen Weges agieren auf verschiedenen Ebenen und sind membrangebunden oder zirkulieren im Blut. Die membrangebundenen Regulatoren CR1, MCP und DAF inhibieren den Alternativen Weg auf Ebene der C3-Konvertase. Protektin, ebenfalls ein membrangebundener Inhibitor, verhindert die Zusammensetzung des Terminalen Komplexes. Zu den löslichen Inhibitoren gehören Faktor H, FHL1, CFHR1, Vitronektin und Clusterin. Faktor H und das alternative Spleiß-Produkt von Faktor H, FHL1 agieren als Regulatoren der C3-Konvertase. Sie sind Kofaktor für Faktor I und beschleunigen den Abbau der C3-Konvertase des Alternativen Weges. CFHR1 bindet die C5-Konvertase und verhindert so die Spaltung von C5. CFHR1, Vitronektin und Clusterin inhibieren die Zusammensetzung des Terminalen Komplexes. Properdin, der einzige bekannte Aktivator der Komplementkaskade, stabilisiert die C3- und die C5-Konvertase.

CR- Komplement- Rezeptor, MCP- Membran- Kofaktor Protein, CFHR- Komplement Faktor H- verwandtes Protein, DAF- Zerfallsbeschleunigender Faktor, FHL- Faktor H- ähnliches Protein

Ist das Komplementsystem einmal aktiviert, unterliegt es einer strengen Kontrolle (Abb. 1B). Es gibt lösliche und membrangebundene Regulatoren, welche die verschiedenen Stufen der Aktivierung des Alternativen Weges kontrollieren. Sie verhindern die Bindung von inflammatorischen Effektorkomponenten an intakte körpereigene Oberflächen und schützen diese somit. Die membrangebundenen Regulatoren CR1, MCP (CD46) und DAF (CD55) inhibieren die C3-Konvertase. Protektin (CD59), ebenfalls ein membrangebundener Inhibitor verhindert die Zusammensetzung des Terminalen Komplexes (Kim und Song 2006). Zu den löslichen Inhibitoren gehören Faktor H und FHL1, CFHR1, sowie Vitronektin und Clusterin.

Faktor H ist der wichtigste Flüssigphase-Regulator des Komplementsystems. Faktor H erkennt Selbst- Oberflächen und konkurriert mit Faktor B um die Bindung an C3b, hat Kofaktor- Aktivität bei der Spaltung von C3b zu iC3b durch Faktor I und beschleunigt den Abbau der C3- und der C5- Konvertase (Walport 2001b, Walport 2001a, Zipfel und Skerka 2009). Der einzig bekannte Aktivator des Alternativen Weges ist Properdin. Properdin stabilisiert sowohl die C3- Konvertase als auch die C5- Konvertase (Kemper et al. 2010, Alcorlo et al. 2013, Leshner et al. 2013).

Des Weiteren zirkulieren im Blut die fünf Faktor H- verwandten Proteine, die *complement factor H-related proteins* (CFHRs). Diesen Proteinen wird eine große Bedeutung bei der Regulation des Komplementsystems zugeschrieben. Die fünf CFHRs sowie Faktor H sind die Mitglieder der CFHR- Familie (Skerka et al. 2013).

4.4 Die CFHR- Familie

Zur CFHR- Familie gehören die Plasma- Glykoproteine CFHR1, CFHR2, CFHR3, CFHR4 und CFHR5, sowie Faktor H und das alternative Spleißprodukt des Faktor H Gens, FHL1. Jedes CFHR Protein und Faktor H wird von einem separaten Gen auf dem Chromosom 1q32 kodiert (Abb. 3). Die einzelnen Proteine werden hauptsächlich in der Leber synthetisiert und sind aus Struktureinheiten, den *short consensus repeats* (SCRs) aufgebaut (Skerka et al. 2013).

Die fünf CFHRs bestehen aus 4 bis 9 SCRs. CFHR1, CFHR2 und CFHR5 gehören zur Gruppe I der CFHRs. Sie können über die N- terminalen SCR1 und SCR2 Dimere bilden und zirkulieren im Blut als Homo- oder Heterodimere und eventuell auch als Multimere (Goicoechea de Jorge et al. 2013). In Abb. 2 ist ein CFHR5 Homodimer gezeigt. CFHR3 sowie CFHR4A und CFHR4B gehören zur Gruppe II der CFHRs. Ihnen fehlt, ebenso wie Faktor H und FHL1 die N- terminale Dimerisierungsregion (Jozsi und Meri 2014).

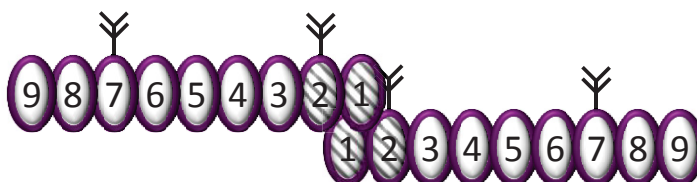


Abb. 2: Struktur von CFHR5 als Dimer- Komplex.

Gezeigt ist einen CFHR5- Homodimer. CFHR5 sowie CFHR1 und CFHR2 können über ihre N- terminale Dimerisierungsdomäne in SCR1 und SCR2 (Schraffur) sowohl Homo- als auch Heterodimer und eventuell auch Multimere bilden.

Faktor H besteht aus 20 SCR und ist das am besten erforschte Mitglied der Familie. Faktor H und sein alternatives Spleißprodukt, FHL1 sind lösliche Inhibitoren des Alternativen Weges und die SCR1 bis SCR4 stellen die Regulatorische Region der Proteine dar. Mithilfe der Regulatorischen Region konkurrieren Faktor H und auch FHL1 mit Faktor B um die Bindung an C3b und erleichtern den Abbau der C3- Konvertase. Faktor H agiert als Kofaktor für Faktor I bei der Spaltung von C3b und bindet mit SCR7 sowie den C- terminalen SCR18 bis SCR20 an Oberflächen (Zipfel et al. 1999, Jozsi und Zipfel 2008).

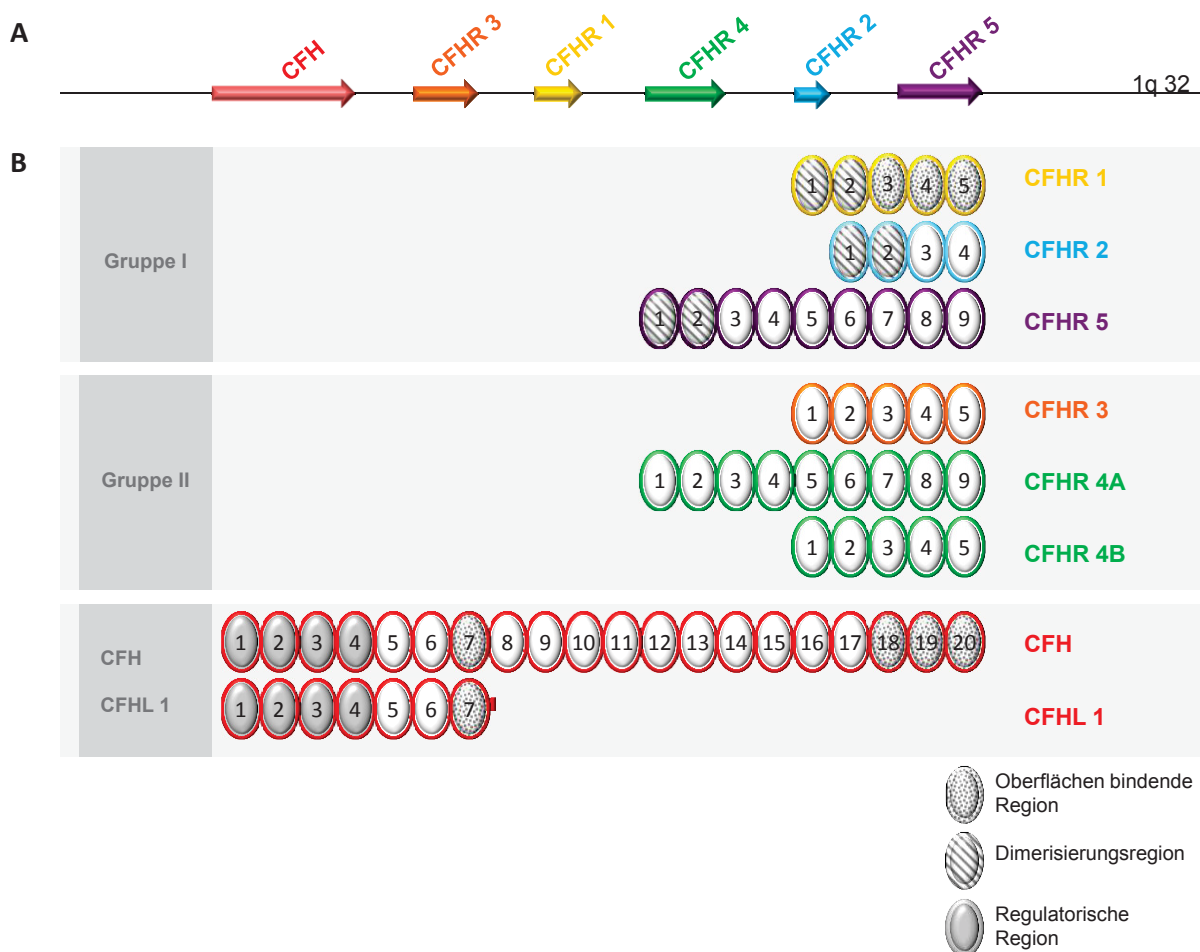


Abb. 3: Chromosomale Anordnung und Struktur der Mitglieder der CFHR- Familie.

(A) Gezeigt ist das CFHR- Gencluster. Die fünf CFHRs und Faktor H werden von separaten Genen auf dem Chromosom 1q32 kodiert. (B) Alle Proteine, die vom CFHR- Gencluster kodiert werden, sind aus Struktureinheiten, den SCRs aufgebaut. CFHR1, CFHR2 und CFHR5 gehören zur Gruppe I der CFHRs und zirkulieren im Blut als Homo- bzw. Heterodimere oder auch als Multimere. CFHR3 und CFHR4 gehören zur Gruppe II der CFHRs, sie besitzen keine Dimerisierungsregion. Faktor H und das Spleißprodukt des Faktor H Gens, FHL1 besitzen als einzige der Familie eine Regulatorische Region in SCR1 bis SCR4. Faktor H bindet über SCR7 und SCR18 bis SCR20 an Oberflächen. CFHR1 bindet ebenfalls über seinen C- Terminus an Oberflächen. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie wird auch für die übrigen CFHRs eine Oberflächenbindungsfunktion im C- Terminus postuliert.

4.5 CFHR- Hybridproteine

Eine der wichtigsten Ursachen für die Entwicklung einer C3- Glomerulopathie sind Änderungen in der Genkopienzahl und strukturelle Veränderungen im Gencluster der CFHR- Familie (Skerka und Zipfel 2008). Die Abb. 4A zeigt das CFHR- Gencluster mit zwei intakten Allelen. Veränderungen wie chromosomale Deletion oder zusätzliche Kopien, wie sie in Abb. 4B dargestellt sind, führen zur Expression von CFHR- Hybridproteinen (Abb. 4C). Bisher sind fünf Hybridproteine bekannt, welche mit der Entwicklung der C3- Glomerulopathie assoziiert sind. Die CFHR- Hybridproteine werden sowohl nach den CFHRs, aus denen sie zusammengesetzt sind, und den entsprechenden SCR- Domänen benannt (CFHR2_{1,2}- CFHR5), als auch nach dem Ort ihrer Entdeckung ('Jena').

CFHR2 _{1,2} - CFHR5	'Jena'	(Chen et al. 2014),
CFHR5 _{1,2} - CFHR5	'Cypriote'	(Gale et al. 2010),
CFHR5 _{1,2} - CFHR2	'US'	(Zhang et al. 2013),
CFHR1 ₁₋₄ - CFHR1	'Spanish'	(Tortajada et al. 2013) und
CFHR3 _{1,2} - CFHR1	'UK'	(Malik et al. 2012).

Die vorgestellten Genkonstellationen wurden bei verschiedenen Patienten mit der Diagnose C3- Glomerulopathie bzw. CFHR5- Glomerulopathie ('Cypriote') nachgewiesen. Doch warum führt die Expression von CFHR- Hybridproteinen zur Ausprägung einer so schweren Nierenerkrankung? Für das 'Jena' Hybridprotein wurde gezeigt, dass CFHR2_{1,2}- CFHR5 die C3- Konvertase des Alternativen Weges im Plasma und auf Oberflächen stabilisiert und dereguliert (Chen et al. 2014). CFHR2_{1,2}- CFHR5 bindet mit hoher Intensität an C3b. Es bildet stabile Komplexe mit der C3- Konvertase und verzögert den Abbau der C3- Konvertase, indem es die Bindung von Faktor H, dem wichtigsten Regulator verhindert. Die Folge ist eine kontinuierliche Komplementüberaktivität die zu einer fortschreitenden Nierenschädigung führt (Chen et al. 2015). Die Überaktivierung des Alternativen Weges des Komplementsystems ist ein zentraler Mechanismus in der Pathogenese der C3- Glomerulopathie (Servais et al. 2013). Jedoch fehlt noch immer eine umfassende Kenntnis, wie die CFHR- Hybridproteine zur lokalen Komplementderegulation in den Glomeruli der Niere und zur Pathogenese der C3- Glomerulopathie führen.

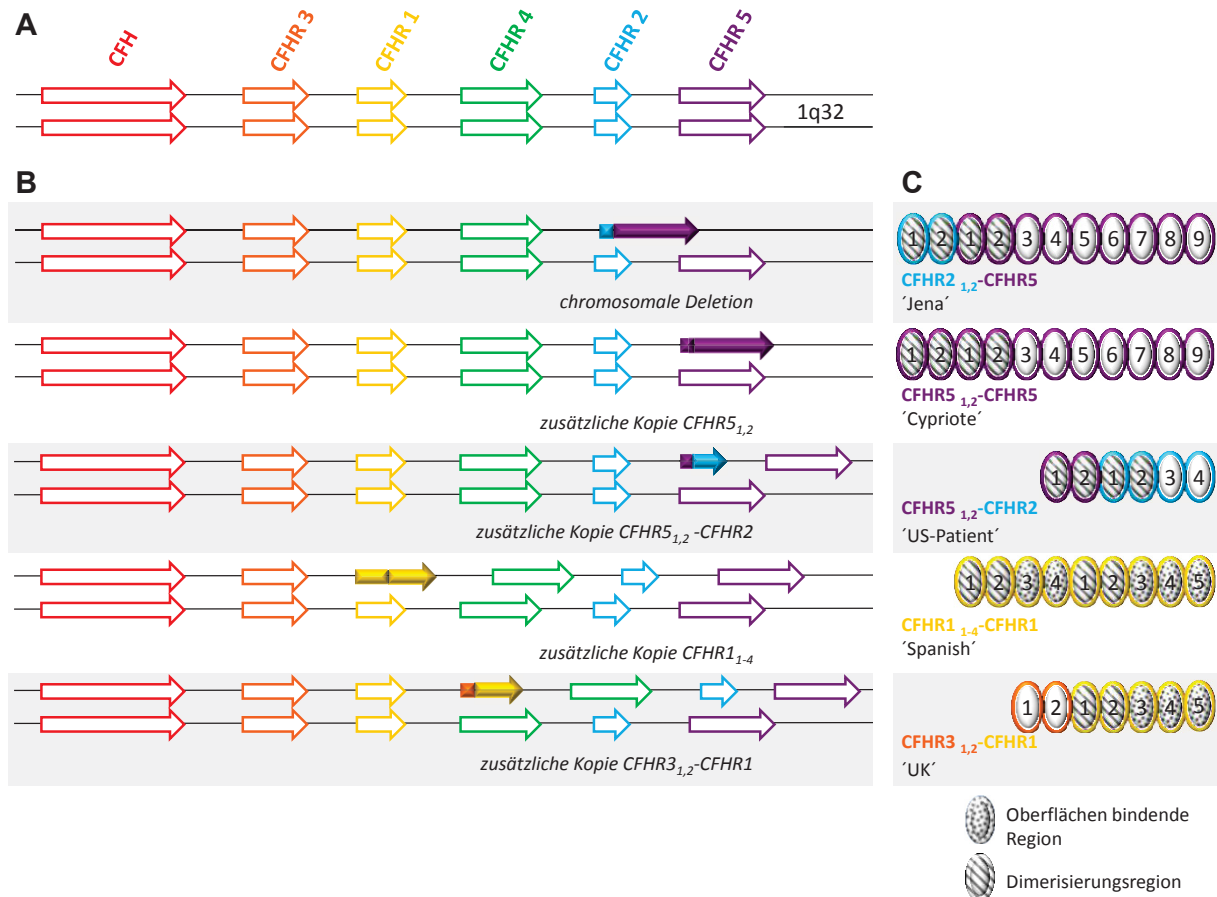


Abb. 4: Strukturelle Veränderungen im CFHR- Gencluster führen zu Expression von CFHR-Hybridproteinen.

(A) Dargestellt ist das CFHR- Gencluster auf dem Chromosom 1q32 mit zwei intakten Allelen. (B) Gezeigt sind die mit der C3- Glomerulopathie assoziierten Szenarien. Hervorgehoben sind die strukturellen Veränderungen im CFHR- Gencluster, welche bei den jeweiligen Patienten zur Expression von CFHR- Hybridproteinen führen. Die Patienten haben jeweils ein mutiertes und ein intaktes Allel. (C) Hier dargestellt sind die SCR- Strukturen der exprimierten Hybridproteine. Gekennzeichnet sind bekannte Oberflächenbindungs- (Punkte) und Dimerisierungsregionen (Schraffur).

Ein wichtiger Ansatz, um die Rolle der CFHR- Hybridproteine als Komplementregulatoren bei der Pathogenese der C3- Glomerulopathie zu verstehen, ist die funktionelle Charakterisierung der CFHR- Proteine. Die Funktion der Wildtyp CFHR Proteine in der Komplementkaskade ist gegenwärtig weitgehend unklar. CFHR1 ist das am besten erforschte CFHR und CFHR1 reguliert die Aktivität der C5- Konvertase. CFHR1 bindet die C5- Konvertase und verhindert die Spaltung des Substrats C5. Desweiteren verhindert CFHR1 auch die Zusammensetzung des Terminalen Komplexes des Komplementsystems. CFHR1 bindet auch C3b und konkurriert mit Faktor H um die Bindung an C3b. CFHR1 besitzt keine Kofaktor Aktivität für Faktor I für die Spaltung von C3b und ist auch nicht in der Lage die Dissoziation der C3- Konvertase zu beschleunigen (Timmann et al. 1991, Heinen et al. 2009). CFHR2 reguliert ebenfalls die Komplementaktivität. Es inhibiert die Aktivität der

C3- Konvertase des Alternativen Komplementweges, indem es die Amplifizierungsschleife unterbricht (Eberhardt et al. 2013). CFHR3 und CFHR4 binden beide an C3b und Heparin, doch ihre genaue Funktion im Komplementsystem ist nicht bekannt (Hellwege et al. 1999).

CFHR5 ist in seiner Entdeckung das jüngste der CFHR Proteine (Zipfel et al. 1999, McRae et al. 2001). Aufgrund der Verknüpfung von CFHR5 zur C3- Glomerulopathie über die CFHR5-Hybridproteine und aufgrund der einzigartigen Mittelregion des Proteins ist in der vorliegenden Dissertation der Fokus auf dieses Komplementprotein gerichtet.

4.6 CFHR5

CFHR5 wurde 2001 als Bestandteil von Komplementablagerungen in glomerulären Präparationen *in vivo* durch immunhistochemische Färbungen entdeckt (McRae et al. 2001, Murphy et al. 2002). CFHR5 ist mit 9 SCRs das längste CFHR Protein (Abb. 5). Das Serumprotein CFHR5 hat eine Masse von 62 bzw. 67 kDa und kommt mit 3- 6 µg/ ml bzw. 100 nM (als Monomer) in normalem humanem Serum vor. Es besitzt zwei Glykosylierungsstellen, in SCR2 und in SCR7, wobei die Glykosylierung an SCR2 manchmal, aber nicht immer vorhanden ist (McRae et al. 2005, Skerka et al. 2013). Desweiteren bildet CFHR5 mit CFHR1 und CFHR2 mithilfe seiner Dimerisierungsregion in SCR1 und SCR2 sowohl Homo- als auch Heterodimere. CFHR5 ist darüber hinaus in der Lage Multimere zu bilden (Chen et al. 2015).



Abb. 5: SCR- Struktur von CFHR5.

CFHR5 besitzt 9 SCRs mit einer fakultativen (SCR2) und einer obligatorischen (SCR7) Glykosylierung. SCR1 und SCR2 repräsentieren die Dimerisierungsregion von CFHR5.

Die Dimerisierungsdomänen in SCR1 und SCR2 von CFHR5 weist eine hohe Sequenzhomologie zu den Dimerisierungsdomänen in SCR1 und SCR2 von CFHR1 und CFHR2 auf (85 %- 100 %; Abb. 6). SCR8 und SCR9 von CFHR5 haben eine hohe Sequenz- Übereinstimmung mit den beiden C- terminalen Oberflächenbindungs- Sequenzen von CFHR1 und Faktor H (CFHR5- CFHR1: 67%, 41 %; CFHR5- Faktor H: 66%, 43%; Abb. 6). CFHR1 und Faktor H binden mit ihren beiden C- terminalen SCRs an Oberflächen (Jozsi und Zipfel 2008, Heinen et al. 2009). Die Homologie lässt vermuten, dass CFHR5 ebenfalls mithilfe seines C- Terminus mit Oberflächen interagieren kann. Einzigartig an CFHR5 ist seine Mittelregion. SCR3 bis SCR7 von CFHR5 weisen eine relativ hohe Übereinstimmung mit der Domäne SCR10 bis SCR14 von Faktor H auf. Kein anderes CFHR

hat eine Homologie zur Mittelregion von Faktor H. Faktor H bindet über seine Mitteldomäne an C3b und C3c. Desweiteren ist an dieser Stelle eine Heparinbindungsdomäne lokalisiert. Eine weitere Interaktionsdomäne für Heparin und C3- Aktivierungsfragmente repräsentieren die beiden C- terminalen SCRs von Faktor H (Jozsi und Zipfel 2008, Goicoechea de Jorge et al. 2013). CFHR5 bindet ebenfalls an Heparin und C3- Aktivierungsfragmente (McRae et al. 2005, Goicoechea de Jorge et al. 2013). Vor dem Hintergrund der Homologie zwischen CFHR5 und Faktor H kann sowohl für die SCR3 bis SCR7 als auch für SCR8 und SCR9 von CFHR5 eine Ligandenbindungsdomäne vermutet werden. Erste Untersuchungen mit Deletionsmutanten zeigten, dass die Mittelregion, i.e. SCR5 bis SCR7, zur Heparinbindung von CFHR5 beiträgt (McRae et al. 2005). Eine Beteiligung des C- Terminus wurde hierbei allerdings nicht ausgeschlossen. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht werden, ob exklusive die Mittelregion oder auch der C- Terminus von CFHR5 die Bindung an Heparin vermitteln. Die Zuordnung der Funktionen von CFHR5 zu den Proteindomänen ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis, wie Domänendopplung im Fall der CFHR5-Hybridproteine zur Deregulation des Komplementsystems beitragen.

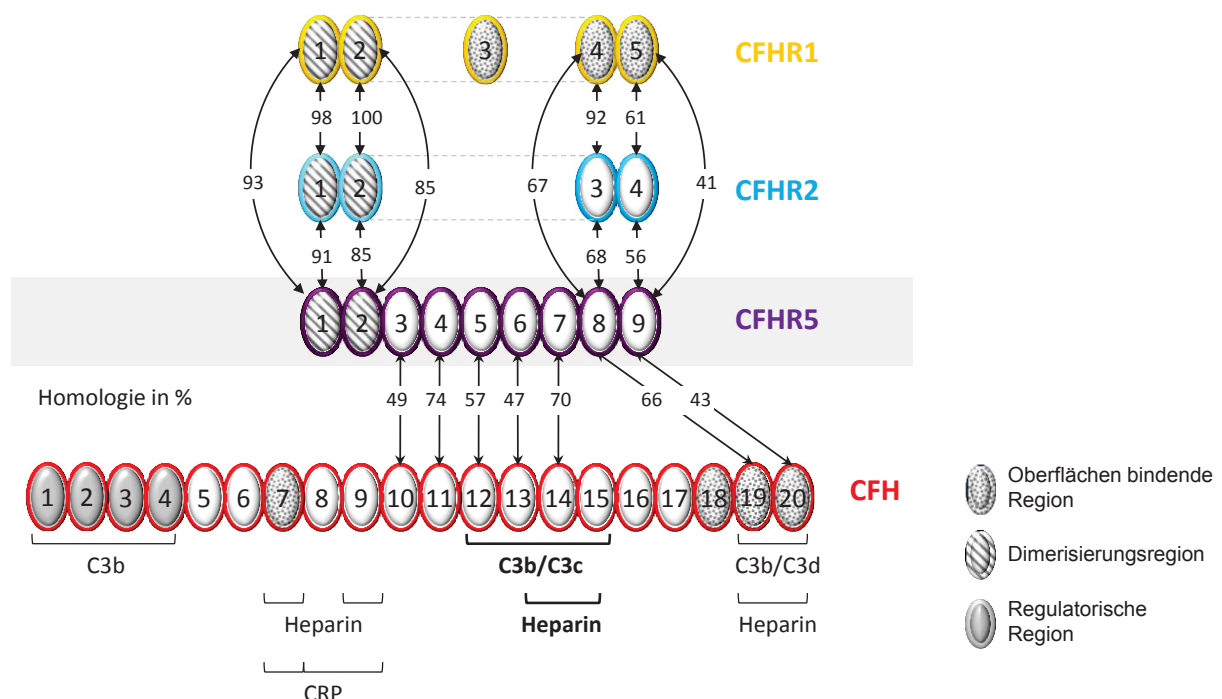


Abb. 6: Homologie von CFHR5, CFHR1 und CFHR2 sowie Faktor H auf Proteinebene.

Dargestellt sind die Homologien zwischen CFHR5, CFHR1 und CFHR2 sowie zwischen CFHR5 und Faktor H in Prozent. Die für die Bindung an C3- Moleküle, Heparin und CRP zuständigen Regionen von Faktor H sind gekennzeichnet. Ebenso sind die bekannten funktionellen Regionen der CFHRs und Faktor H hervorgehoben.

Die physiologische Bedeutung von CFHR5 ist bisher nur wenig verstanden. CFHR5 bindet an C3b, iC3b und C3dg. CFHR5 konkurriert mit Faktor H um die Bindung an C3b. Deshalb wird postuliert, dass CFHR5 die Aktivität des Komplementsystems moduliert (Goicoechea de Jorge et al. 2013). McRae et al. (2005) zeigte, dass CFHR5 Kofaktor- Aktivität für Faktor I hat und die Aktivität der C3- Konvertase inhibiert. Der Nachweis gelang jedoch nur unter Verwendung hoher, unphysiologischer Konzentrationen. Chen et al. (2014) konnte dahingegen zeigen, dass CFHR5 den Aufbau der C3- Konvertase erhöht. Auch aktuellste Studien belegen, dass CFHR5 das Komplementsystem aktiviert (Csincsi et al. 2015). Bereits 2002 publizierte Murphy et al., dass CFHR5 in glomerulären Komplementablagerungen der Niere vorhanden ist. Deshalb postulierten die Autoren, dass CFHR5 ein Mediator bei glomerulären Erkrankungen ist und diese Ansicht ist noch immer aktuell (Zipfel et al. 2015). Die Erforschung dieses Komplementproteins bietet eine wichtige Grundlage für das Verständnis von CFHR5 als Komplementregulator. Dieser Ansatz kann zeigen, wie Veränderungen der CFHR5- Proteinstruktur und die Expression von CFHR5- Hybridproteinen zur Entstehung der komplexen Nierenerkrankung C3- Glomerulopathie führen.

5 Ziele der Arbeit

Ziel meiner experimentellen medizinischen Dissertation ist es, das Komplementprotein CFHR5 zu untersuchen. Die Analyse von CFHR5 soll die Bedeutung von CFHR5- Hybridproteinen bei der Pathogenese der C3- Glomerulopathie herausstellen.

Um die Oberflächenbindung und Ligandeninteraktion von CFHR5 zu untersuchen, wurde CFHR5 rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Zur Darstellung der jeweiligen Oberflächenbindungs- und Interaktionsdomänen wurden vier CFHR5 Deletionsmutanten exprimiert und eingesetzt.

Mit diesem Ansatz sollen folgende Fragen beantwortet werden:

I. Oberflächenbindung von CFHR5

Bindet CFHR5 an Zellen (CHO Zellen, HUVEC)?

Bindet CFHR5 unterschiedlich stark an intakte, früh- und spätapoptotische bzw. nekrotische Zellen?

II. Ligandeninteraktion von CFHR5

Mit welcher Region bindet CFHR5 an Heparin?

Bindet CFHR5 an C3- Aktivierungsfragmente?

Interagiert CFHR5 mit Properdin, dem einzig bisher bekannten Komplement- Aktivator?

III. Lokalisation der Oberflächenbindungs- und Interaktionsdomänen von CFHR5

Mit welchen Regionen bindet CFHR5 an Oberflächen und welche Regionen von CFHR5 sind für die Ligandeninteraktion von Bedeutung?

Hat CFHR5 eine oder mehrere Interaktionsdomänen für die untersuchten Liganden?

Die Untersuchungen sollen klären, wie CFHR5 die Komplementaktivität auf Oberflächen reguliert. Es soll dargestellt werden, was die Funktion von CFHR5 ist und wie die CFHR5- Hybridproteine diese physiologische Funktion verändern.

6 Material und Methoden

Proteinchemische und molekularbiologische Standardmethoden wurden in Anlehnung an die Protokollsammlung „*Current Protocols in Molecular Biology*“ (Ausuble et al., 2003) sowie nach Gebrauchsanweisungen der Firma Roth durchgeführt.

Soweit nicht anders beschrieben wurden alle Chemikalien von den Standardlaborchemikalienherstellern Amresco, Roth und Sigma in höchster Qualität und Reinheitsstufe verwendet. Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (*D. Phosphate Buffered Saline*, DPBS), Zellkulturmedien und Zusätze wurden, wenn nicht anders beschrieben, von der Firma Lonza bezogen.

Alle Berechnungen zu verwendeten Stoffmengenkonzentrationen beziehen sich auf den Monomierzustand der eingesetzten Proteine.

6.1 Ortsgerichtete Mutagenese, Proteinexpression und Aufreinigung

Die cDNA des Proteins CFHR5, sowie die cDNA der CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} waren bereits durch Vorarbeiten von Dr. Qian Chen (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) im Labor vorhanden.

6.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese zur Generierung des CFHR5 Mittelfragments

Zur Generierung des Mittelfragments CFHR5₃₋₇ wurden 100 ng der cDNA des Fragments CFHR5₃₋₉ auf dem Expressionsvektor cDNATM4/TO/*myc*-His B (Invitrogen) als Ausgangsmaterial verwendet. Zur Deletion der für SCR8 und SCR9 kodierenden Nukleotidsequenz wurden, gemäß des optimierten Protokolls des Herstellers (QuikChange® *Lightning Site- Directed Mutagenesis*, Stratagene), jeweils 150 ng der folgend aufgeführte Primer zum Ansatz hinzugegeben:

Sense 5' CAATCCTTGCCTAGATGTGTCGATGACGACGACAAAGGTCTAG 3'

Antisense 3' CTAGACCTTTGTCGTCGTCATCGACACATCTAGGCAAGGATTG 5'

Nach 18 PCR- Zyklen (20 sek Denaturierung bei 95 °C, 10 sek Primerhybridisierung bei 60 °C, 30 sek Verlängerung bei 68 °C) wurde die methylierte parenterale cDNA mit 1 µl des Restriktionsenzym Dpn1 (Stratagene) verdaut (30 min, 37 °C). Anschließend wurden 45 µl XL10-Gold® ultrakompetente *E. coli* Zellen (Stratagene) mit 5 µl der mit Dpn1 behandelten cDNA durch Hitzeschock (30 sek im 42 °C Wasserbad) transformiert und auf LB- Ampicillin- Agarmedium (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Die transformierten *E. coli* wurden für 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Ampicillin-resistenten, positiven Kolonien wurden ausgewählt und in LB- Ampicillin- Flüssigkultur (100 µg/ml Ampicillin) über 14 h bei 180 rpm und 37 °C weiter vermehrt und im Anschluss

daran aufgereinigt (QIAprep® *Spin Miniprep Kit*, QIAGEN). Hiernach wurde eine Sequenzierung nach Sanger mit den spezifischen Primern des cDNATM4/TO/*myc*-His B Vektors (*CMV forward* (Invitrogen), *BGH reverse* (Invitrogen)) zum Nachweis der gewünschten Mutation durchgeführt. Nach Auswahl des Ansatzes mit korrekter Mutagenese wurde die entsprechende cDNA zur Vervielfältigung in XL1 Blue chemokompetente *E. coli* (im Haus hergestellt) wie oben beschrieben durch Hitzeschock transformiert, in LB-Ampicillin- Flüssigkultur über 14 h bei 180 rpm und 37 °C vermehrt und danach für die Transfektion in Humane embryonale Nierenzellen (HEK- Zellen) mit dem *Plasmid Mega Kit* (QIAGEN) aufgereinigt.

6.1.2 HEK- Zellsystem zur Expression der rekombinanten Proteine

HEK- 293 Zellen (ACC- 305) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei Erreichen von Subkonfluenz geerntet.

Die HEK Zellen wurden nach Angaben des Herstellers Polyplus- Transfektion mit Polyethylenimin (jetPEI®, Polyplus) und der cDNA von CFHR5 bzw. CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ oder CFHR5_{8,9} transient transfiziert. Pro Ansatz wurden 60 µl Polyethylenimin und 30 µg der jeweiligen cDNA zu 9*10⁶ HEK Zellen in 20 ml Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertem FBS, 1 % Glutamin und 0,05 % Gentamycin) hinzugefügt. Nach den ersten 16 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Kulturmedium durch serumfreies Medium ersetzt. 96 h nach Transfektion wurde der Überstand zum ersten Mal geerntet und die Kulturflaschen mit neuem serumfreien Medium gefüllt, um eine zweite Überstandgewinnung nach 192 h zu ermöglichen.

6.1.3 Aufreinigung der Proteine mittels Nickel- Chelatchromatographie

Die rekombinant in HEK Zellen hergestellten Proteine enthielten C- terminal 6 Histidin-Reste und wurden mittels Nickel- Chelat- Affinitätschromatographie aufgereinigt. Der Ausgangspuffer enthielt 10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄ und 500 mM NaCl gelöst in destilliertem H₂O. Hinzugefügtes Imidazol und Glycerol sowie der eingestellte pH werden nachfolgend in Klammern aufgeführt.

Die Nickel- Agarose (HisPurTM *Ni-NTA Resin*, Thermo Scientific) wurde im Bindungspuffer (5 mM Imidazol; pH 7,8- 8,0) equilibriert und anschließend mit dem ebenfalls im Bindungspuffer verdünnten Zellkulturüberstand beladen. Die Bindung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten an die Nickel- Agarose erfolgte innerhalb 1 h bei 4 °C. Der verdünnte Überstand und die Nickel-Agarose wurden durch eine Chromatographie- Säule (Econo-Column® *Chromatography Columns* 2,5 x 50 cm, Biorad) gegossen, wobei die

Nickel- Agarose in der Säule zurückblieb und der Durchfluss aufgefangen wurde. Nachdem unspezifische Bindungen an die Nickel- Agarose durch Waschen mit Waschpuffer 1 (10 mM Imidazol; pH 7,4) und Waschpuffer 2 (25 mM Imidazol; pH 7,4) gelöst wurden, erfolgte die Ablösen der Proteine von der Nickel- Agarose mit dem Elutionspuffer (700 mM Imidazol; 10 % Glycerol; pH 7,4).

Im Anschluss wurde die Probe nach Angaben des Herstellers in einem Konzentrator (Pierce® *Concentrators*, 9K MWCO/ 20 ml, Thermo Scientific) auf ein Endvolumen von 100-200 µl konzentriert.

Zur experimentellen Untersuchung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten wurden die Proben in DPBS überführt. Hierzu wurden Dialyseeinheiten (Slide-A-Lyser® *MINI Dialysis Units* 10.000 MWCO, Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet und der Dialysepuffer mehrmals ausgetauscht.

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm am Spektrophotometer (ND-1000, Thermo Scientific) bestimmt und zum Probenvergleich semiquantitativ im Silbergel (reduzierender Probenpuffer, 10 % Acrylamidgel) erfasst.

Zur experimentellen Analyse standen nun das CFHR5 sowie die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9} zur Verfügung.

6.2 Antikörpertestung im ELISA

Untersucht wurde die Affinität des mAk- hc- Myc Antikörpers (*Monoclonal Mouse IgG₁ Clone #9E10*, R&D Systems) und des mAk- CFHR5 Antikörpers (*Monoclonal Mouse IgG₁ Clone #390513*, R&D Systems) zu CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten. Hierzu wurden 50 nM von CFHR5, CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} sowie BSA zu einem Endvolumen von 50 µl in DPBS verdünnt, in Kavitäten einer ELISA- Platte (F96 MaxiSorp, *Nunc-Immuno Module*, Sigma) geladen und über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Die Kavitäten wurden geleert und ungebundenes Protein durch dreimaligem Waschen mit 150 µl Waschpuffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 0,1 % Tween20; pH 7,4) entfernt. Freie Bindestellen wurden mit jeweils 100 µl Blockpuffer (2% BSA gelöst in Waschpuffer) pro Kavität bei Raumtemperatur 1 h gesättigt. Nach dem Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation der primären Antikörper (mAk- hc- Myc bzw. mAk- CFHR5) mit einer Verdünnung von 1:2000 für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dem Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation des sekundären, an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörpers (*Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP*, Dako). Dieser wurde ebenfalls 1:2000 verdünnt und für 1 h und Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die

Kavitäten wiederum geleert und es folgten vier Waschschr tte. Zur kolorimetrischen Detektion wurden jeweils 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) PLUS2™ *ready-to-use substrate* (Kem-En-Tec Diagnostics) für 1 min in den Kavitäten inkubiert und die Reaktion anschließend mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Analyse der Farbreaktion erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm (*Safire²™ Mikroplate Reader*, Tecan).

6.3 Zellbindungsanalyse der rekombinanten Proteine CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten

6.3.1 Untersuchung der Proteinbinding an CHO-Zellen

CHO- K1 Zellen (ACC 110) wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei Erlangen von Konfluenz geerntet.

CHO Zellen wurden aus der Kultur entnommen und mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) gelöst. Die Zellzahl wurde am *CASY Cell Counter* (CASY1, Schärfe System) bestimmt und 0,35*10⁶ Zellen pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden 2 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand per Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet in 500 µl Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert und wiederum 2 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschr tt wurde wie beschrieben wiederholt. Danach wurden die Proben hinzugefügt. 200 bzw. 1000 nM von CFHR5, CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} wurden hierzu zu einem Volumen von 50 µl in   PBS (72,5 mM NaCl; 3,35 mM Na₂HPO₄; 1,65 mM NaH₂PO₄; 1,35 mM KCl; pH 7,5) verdünnt. CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten wurden zu den Zellen hinzugefügt, die Zellen resuspendiert und 30 min bei 300 rpm und 30 °C inkubiert. Die Entfernung des Überstandes nach Zentrifugation und ein Waschschr tt erfolgten wie oben beschrieben. Hiernach folgte die Inkubation des ersten Antikörpers mAk-hc-Myc (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems). Hierzu wurde dieser 1:400 in Waschpuffer verdünnt und jeweils 50 µl zu jedem Ansatz gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation, Entfernung des Überstandes und einem Waschschr tt wurde der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper (*Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment, Alexa Fluor® 647 Conjugate*, Cell Signaling) ebenfalls 1:400 in Waschpuffer verdünnt und 50 µl pro Ansatz für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation, Entfernung des Überstandes und einem letzten Waschschr tt zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurden die Proben noch einmal 2 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl 4',6-Diamidino-2-phenylindole- Lösung (DAPI, Sigma, 1:10000 verdünnt in Waschpuffer) resuspendiert.

Es folgte die Analyse am Durchflusszytometer (BD™ LSR II). Durch freigelegte und mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI markierte DNA ließen sich tote von intakten Zellen unterscheiden. Die Auswertung der Daten erfolgte in der FlowJo 7.2.5 Software.

6.3.2 Analyse der Bindung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC

6.3.2.1 Produktion intakter, früh- und spätapoptotischer sowie nekrotischer HUVEC

Für die Experimente wurden HUVEC (ATCC CRL- 1730) verwendet, welche bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und bei Erlangen von Konfluenz geerntet wurden.

Zur Gewinnung intakter HUVEC wurden diese am Versuchstag aus der Zellkultur entnommen, mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein Falcon überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 100 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 3 ml Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert und erneut für 5 min bei 100 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 2 ml Waschpuffer resuspendiert und die Zellzahl am *CASY Cell Counter* (CASY®1, Schärfe System) bestimmt. Als Zentrifugationsgeschwindigkeit für intakte Zellen wurde in allen Schritten 100 g gewählt.

Die Daten zur Konzentration und Inkubationszeit von Staurosporin zur Herstellung von früh- und spätapoptotischen HUVEC wurden von Dr. Hans- Martin Dahse (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung frühapoptotischer HUVEC wurden 14 h vor Beginn der Messung $1 \cdot 10^6$ HUVEC aus der Kultur in neue Zellkulturflaschen (*cell culture flask*, 250 ml, 75 cm², PS, Greiner) gesäht. Es wurden 14 ml serumfreies DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) Kulturmedium sowie 0,4 µg Staurosporin (Serva) pro ml serumfreien Mediums hinzugefügt. Die eingesähte Flasche wurde für 1 h bei 200 rpm und Raumtemperatur auf einem Schüttler belassen, um ein Adhären der Zellen am Boden der Zellkulturflasche zu verhindern. Danach wurde sie bis zum Versuchsbeginn im Brutschrank bei 37 °C und 5 % belassen. Am Versuchstag wurde der Inhalt der Zellkulturflasche in ein Falcon überführt und eventuell anhaftende Zellen mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) gelöst und ebenfalls überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 150 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 3 ml Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert. Erneut wurde für 5 min bei 150 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 2 ml Waschpuffer resuspendiert und die Zellzahl am *CASY Cell Counter* (CASY®1,

Schärfe System) bestimmt. Für frühapoptotische Zellen wurde in allen Schritten eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 150 g gewählt.

Zur Herstellung spätapoptotischer HUVEC wurde ebenso wie bei den frühapoptotischen verfahren. Allerdings betrug die Inkubationszeit des Staurosporins 24 h und als Zentrifugationsgeschwindigkeit wurde in allen Schritten 300 g gewählt.

Zur Produktion nekrotischer HUVEC wurden am Versuchstag HUVEC aus der Zellkultur entnommen. Die Zellen wurden für 5 min bei 2000 g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 3 ml Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert und erneut für 5 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 2 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die gewünschte Menge in Reaktionsgefäße überführt und die Nekrose durch Hitze induziert. Hierzu wurden die Zellen für 1 h bei 750 rpm auf 65 °C erwärmt. Danach erfolgte das Aliquotieren der nekrotischen Zellen mithilfe der *CASY Cell Counter*- Angabe vor der Nekroseinduktion. Für alle Schritte wurde zur Zentrifugation der nekrotischen HUVEC 2000 g gewählt.

Als Kontrolle zur Feststellung der erfolgreichen Apoptose- bzw. Nekroseinduktion diente die Mikroskopie der Zellen sowie durchflusszytometrische Analysen mit den Farbstoffen Annexin V (*Pacific Blue*TM, Life Technologies), 4',6-Diamidino-2-phenylindole- Lösung (Sigma) und Propidium Iodid (Life Technologies).

6.3.2.2 Bindungsnachweis durch Western Blot

Im ersten Schritt nach der Herstellung intakter, früh- und spätapoptotischer sowie nekrotischer HUVEC wurden pro Ansatz $0,25 \cdot 10^6$ Zellen aliquotiert und bei entsprechender Geschwindigkeit 5 min zentrifugiert (intakt: 100 g, frühapoptotisch: 150 g, spätapoptotisch: 300 g, nekrotisch 2000 g). Danach erfolgte die Bindung von CFHR5 sowie CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9}. Hierzu wurden 300 nM der Proteine zu einem Volumen von 50 µl in ½ PBS (72,5 mM NaCl; 3,35 mM Na₂HPO₄; 1,65 mM NaH₂PO₄; 1,35 mM KCl; pH 7,5) verdünnt und zum Zellpellet hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden 50 µl ½ PBS verwendet. Die Zellen wurden resuspendiert und für 30 min bei 300 rpm und 30 °C mit den Proteinen inkubiert. Hierauf wurde 5 min bei entsprechender Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand mittels Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 500 µl Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert. Es folgten 5 min Zentrifugation und Entfernung des Überstandes durch Absaugen. Das Zellpellet wurde anschließend in 45 µl Lysepuffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris; 2 mM EDTA; 1 % NP-40; pH 7,6) mit Zusatz von 1:500 Protease- Inhibitor (Sigma) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte bei 4 °C 30 min auf Eis. Das Lysat wurde danach für 15 min bei 15.000 g zentrifugiert, sodass

sich größere Partikel des Lysats als Pellet absetzten. 40 µl des Lysats wurden daraufhin entnommen und mit 14 µl nichtreduzierendem Probenpuffer (Roti®-Load 3(LDS), Roth) gemischt.

Der Nachweis der Proteinbindung an die HUVEC erfolgte im Western Blot. Es wurden 25 µl des mit Probenpuffer gemischten Lysats in Taschen von 10 % Acrylamidgelen geladen. Als Kontrolle dienten ½ PBS sowie 20 nM von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten verdünnt in ½ PBS und gemischt mit nichtreduzierendem Probenpuffer. Zur Markierung der Proteinmasse wurde *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) als Marker aufgetragen. Die mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden wurden im Semidry- Verfahren vom Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (Protan BA 83, GE Healthcare) übertragen. Im Anschluss wurden die freien Bindestellen der Membran 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (4 % Milchpulver; 1 % BSA in Waschpuffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 0,1 % Tween20; pH 7,4)) gesättigt. Der primäre Antikörper, mAk-hc-Myc (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems) wurde 1:2000 in Blockpuffer verdünnt und zur Erhöhung der Antikörperbindung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung des primären Antikörpers wurde die Membran viermal in Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit dem Meerrettichperoxidase- gekoppelten sekundären Antikörper, *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse* (Dako) in ebenfalls 1:2000 Verdünnung inkubiert. Es folgten fünf Waschschrte und die Äquilibration mit Chemilumineszenz- Substrat (*CheLuminate-HRP PicoDetect*, AppliChem). Zur Detektion der Chemilumineszenz wurde die Membran im Dunkelraum für 15 min auf Universalfilme (Super RX, Fujifilm) gelegt und der Film anschließend entwickelt.

6.3.2.3 Durchflusszytometrische Bindungsanalyse

Nach der Herstellung intakter, frühapoptotischer sowie nekrotischer HUVEC wurden pro Ansatz $0,3 \cdot 10^6$ Zellen aliquotiert und bei entsprechender Geschwindigkeit 5 min bei 4 °C zentrifugiert (intakt: 100 g, frühapoptotisch: 150 g, nekrotisch 2000 g). Danach erfolgte die Bindung von CFHR5 sowie CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9}. Es wurden 50, 200 und 500 nM der Proteine zu einem Volumen von 50 µl in ½ PBS (72,5 mM NaCl; 3,35 mM Na₂HPO₄; 1,65 mM NaH₂PO₄; 1,35 mM KCl; pH 7,5) verdünnt und zum Zellpellet hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurden 50 µl ½ PBS verwendet. Die Zellen wurden resuspendiert und für 30 min bei 300 rpm und 30 °C mit den Proteinen inkubiert. Hierauf wurde 5 min bei entsprechender Geschwindigkeit zentrifugiert, der Überstand mittels Vakuumpumpe vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 500 µl Waschpuffer (2 % BSA gelöst in DPBS) resuspendiert. Es folgten 5 min Zentrifugation und Entfernung des Überstandes

durch Absaugen. Hiernach erfolgte die Inkubation des ersten Antikörpers mAk-hc-Myc (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems). Hierzu wurde dieser 1:400 in Waschpuffer verdünnt und jeweils 50 µl zu jedem Ansatz gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde nach 5 min Zentrifugation entfernt und es folgte ein Waschschrift. Der zweite, fluoreszenzmarkierte Antikörper (*Anti-Mouse IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment, Alexa Fluor® 647 Conjugate*, Cell Signaling, 1:400) und Annexin V (*Pacific Blue™*, Life Technologies, 1:100) wurden im Annexin- Bindungspuffer (1,4 M NaCl; 10 mM Tris; 2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl; pH 7,4) verdünnt. Pro Ansatz wurden 50 µl hinzugefügt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei entsprechender Geschwindigkeit, Entfernung des Überstandes und einem letzten Waschschrift wurden die Proben 5 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl Annexin- Bindungspuffer resuspendiert.

Es folgte die Analyse der Proteinbindung am Durchflusszytometer (BD™ LSR II). Durch Annexin- markiertes Phosphatidylserin, welches infolge von apoptotischen oder nekrotischen Vorgängen von der inneren auf die äußere Zellmembran verlagert wird, konnten apoptotische und nekrotische Zellen von intakten unterschieden werden. Die Auswertung der Daten erfolgte in der FlowJo 7.2.5 Software.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von CFHR5 sowie CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ wurde zusätzlich für intakte und nekrotische HUVEC auch unter Verwendung von mAk- CFHR5 (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems) als Primärantikörper durchgeführt. Hierbei wurde zusätzlich auch Annexin V durch den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindole (Sigma, zur Anwendung siehe 6.4.1) ersetzt.

6.3.2.4 Untersuchung der Proteinbindung im konfokalen Laser Scanning Mikroskop

Für die Generierung von Fluoreszenzmikroskopie- Aufnahmen wurden die verbleibenden Zellen aus der durchflusszytometrischen Analyse genutzt. Ausgewählt wurden die 500 nM Ansätze von CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9}, bei denen der Primärantikörper mAk-hc-Myc verwendet wurde. Die Zellen wurden zur Erhöhung der Zellzahl für die Mikroskopie bei entsprechender Geschwindigkeit 5 min bei 4 °C zentrifugiert (intakt: 100 g, frühapoptotisch: 150 g, nekrotisch 2000 g), der Überstand bis auf etwa 50 µl verworfen und das Pellet anschließend resuspendiert. 10 µl der Zellen wurden auf einen Objektträger gebracht und für 15 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit dem Eindeckmittel *Pro Taps Mount Fluor* (BIOCYC) auf dem Objektträger eingebettet und bei 4 °C getrocknet (intakte und frühapoptotische HUVEC: 30 min, nekrotische HUVEC: über Nacht). Anschließend erfolgte die Analyse der Proteinbindung am

Fluoreszenzmikroskop. Für alle Aufnahmen wurden gleiche Lasereinstellungen und die gleiche Vergrößerung (64er Objektiv, 2-fach Zoom) verwendet.

6.4 Untersuchung der Heparinbindung mittels ELISA

Nach Angaben des Herstellers wurden 50 µl Heparin (*Heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa*, Fluka) mit einer Konzentration von 50 µg/ml (gelöst in DPBS) über Nacht bei Raumtemperatur in den Kavitäten Heparin-bindender Platten (Becton Dickinson) immobilisiert. Die Kavitäten wurden geleert, dreimal mit 150 µl Waschpuffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 0,1 % Tween20; pH 7,4) zur Entfernung von ungebundenem Heparin gewaschen. Anschließend wurden freie Bindestellen 1 h mit 100 µl Blockpuffer (2% BSA gelöst in Waschpuffer) bei 37 °C gesättigt. Daraufhin wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Bindung der Liganden. 50 nM von CFHR5, CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} wurden hierzu zu einem Endvolumen von 50 µl in DPBS verdünnt und für 1 h bei 37 °C gebunden. Durch Leeren der Kavitäten und viermaliges Waschen wurde ungebundenes Protein entfernt. 50 µl des ersten Antikörpers, mAk-hc-Myc (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems) wurden in einer Verdünnung von 1:2000 hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kavitäten wurden geleert, es wurde viermal mit Waschpuffer gewaschen und der zweite Antikörper, *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP* (Dako) ebenfalls in 1:2000 Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden zur kolorimetrischen Detektion jeweils 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) *PLUS2™ ready-to-use substrate* (Kem-En-Tec Diagnostics) für 2 min in den Kavitäten inkubiert und die Reaktion anschließend mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Analyse der Farbreaktion erfolgte durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm (*Safire²™ Mikroplate Reader*, Tecan). Als Kontrolle zur Erfassung des Hintergrundes diente DPBS, wovon 50 µl anstelle der Liganden geladen wurden.

6.5 Untersuchung der Bindung an C3- Moleküle und Properdin mittels ELISA

Jeweils 50 nM von C3b, iC3b, C3c, C3d und Properdin (CompTech) verdünnt zu 50 µl in DPBS wurden über Nacht bei 4 °C in den Kavitäten von einer ELISA- Platte (F96 MaxiSorp, Nunc-Immuno Module, Sigma) gebunden. Nach dem Leeren der Kavitäten und dreimaligem Waschen mit 150 µl Waschpuffer (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 0,1 % Tween20; pH 7,4) wurden freie Bindestellen mit 100 µl Blockpuffer (2 % BSA gelöst in Waschpuffer) gesättigt. Nach dem Leeren der Kavitäten und dreimaligem Waschen erfolgte die Bindung der Liganden. Hierzu wurden 50 nM von CFHR5, CFHR5_{1,2},

CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} zu einem Endvolumen von 50 µl in DPBS verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur gebunden. Nach dem Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen mit 150 µl Waschpuffer wurden 50 µl des ersten Antikörpers hinzugegeben. Der mAk-hc-Myc Antikörper (*Monoclonal Mouse*, R&D Systems) wurde hierzu 1:2000 in Waschpuffer verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation des zweiten, Meerrettich- Peroxidase- gekoppelten Antikörpers *Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins/ HRP* (Dako) in 1:2000 Verdünnung für 1 h bei Raumtemperatur. Nach dem Leeren der Kavitäten und viermaligem Waschen wurden zur kolorimetrischen Detektion pro Kavität 50 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) *PLUS2™ ready-to-use substrate* (Kem-En-Tec Diagnostics) für 2 min inkubiert und die Reaktion anschließend mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt. Die Farbreaktion wurde durch Absorptionsmessung bei 450 nm (*Safire²™ Mikroplate Reader*, Tecan) untersucht. Als Kontrolle zur Erfassung des Hintergrundes diente DPBS, wovon 50 µl anstelle der Liganden geladen wurden.

7 Ergebnisse

7.1 CFHR5 und die CFHR5- Deletionsmutanten

CFHR5 und die einzelnen CFHR5 Deletionsmutanten sind in Struktureinheiten, den *short consensus repeats* (SCRs) gegliedert (Abb. 7A). SCR1 und SCR2 von CFHR5 repräsentieren eine Dimerisierungsdomäne (durch Schraffur gekennzeichnet). SCR2 von CFHR5 ist manchmal aber nicht immer glykosyliert, es gibt eine glykosylierte und eine nicht glykosylierte Variante. SCR7 von CFHR5 ist dahingegen immer mit einer Kohlenhydratseitenkette versehen. Die berechnete Molekularmasse für das Monomer-CFHR5 Protein beträgt 62 kDa (einfach glykosyliert) bzw. 67 kDa (zweifach glykosyliert). Die berechneten molekularen Massen für die einzelnen in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutanten sind in Abb. 7B dargestellt.






	A	B
	SCR- Struktur	Berechnete Molekülmassen der monomeren Einheiten (kDa)
CFHR5		62, 67
CFHR5 _{1,2}		14, 19
CFHR5 ₃₋₇		34
CFHR5 ₃₋₉		48
CFHR5 _{8,9}		14

Abb. 7: Struktur und berechnete molekulare Masse von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten.

(A) Gezeigt ist die Struktur von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten. Jedes Oval kennzeichnet ein SCR als strukturelle und mögliche funktionelle Einheit. Die Dimerisierungsdomäne in SCR1 und SCR2 ist schraffiert, die "Bäumchen" kennzeichnen Kohlenhydratseitenketten an SCR2 (manchmal vorhanden) und an SCR7. (B) Die Spalte B zeigt die berechnete molekulare Masse der monomeren Einheiten der rekombinant exprimierten Proteine in kDa (verwendetes Programm: „ExPASy ProtParam“).

7.2 Herstellung des CFHR5 Mittelfragments mittels gerichteter Mutagenese

Die cDNA des CFHR5 Proteins sowie der CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} waren aus Vorarbeiten von Dr. Chen (Abteilung Infektionsbiologie, HKI Jena) im Labor vorhanden. Als Ausgangsmaterial für die Generierung des CFHR5 Mittelfragments SCR3 bis SCR7 diente die cDNA des Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ zwischen den Schnittstellen Kpn I und Xba I auf dem Expressionsvektor cDNATM4/TO/*myc*-His B (Abb. 8).

Ausgehend von diesem Template wurde mittels geeigneter Primer der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₇ generiert. Zur Überprüfung des Erfolges der gerichteten Mutagenese wurde eine Sanger Sequenzierung durchgeführt. Aus der Sanger Sequenzierung ergab sich für den Primer „*CMV forward*“ eine Übereinstimmung von 100 % mit der gewünschten Oligonukleotidsequenz von CFHR5₃₋₇. Die Sequenz des „*BGH reverse*“-Primers stimmte zu 99 % überein. Die Abweichung der „*BGH reverse*“- Primer- Sequenz entstand durch eine Lücke in der Abfolge. Diese Lücke wurde vom „*CMV forward*“- Primer abgedeckt und zeigt, dass die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung vollständig mit der gewünschten Oligonukleotidabfolge von CFHR5₃₋₇ übereinstimmen und die Herstellung des CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ erfolgreich war.

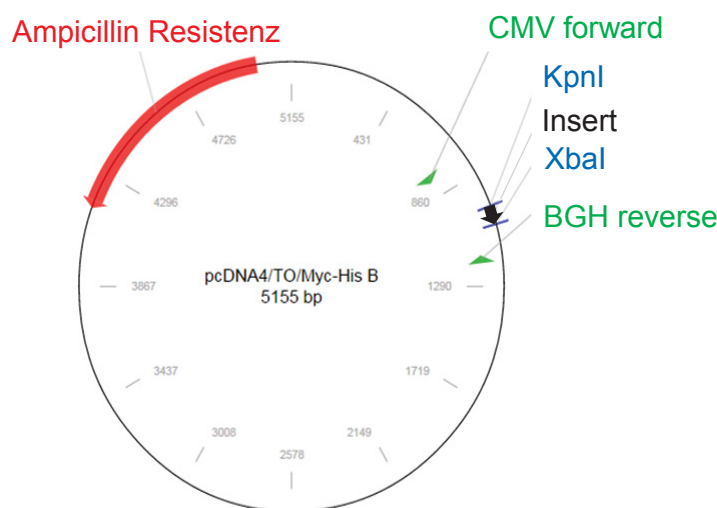


Abb. 8: Expressionsvektor cDNATM4/TO/*myc*-His B.

Gezeigt ist der verwendete Expressionsvektor mit den Schnittstellen KpnI und XbaI. Zwischen den Schnittstellen befinden sich die Oligonukleotidsequenz von CFHR5 bzw. der CFHR5 Deletionsmutanten. Desweiteren zeigt die Karte Startpunkte für den „*CMV forward*“- und den „*BGH reverse*“- Primer, die die Sequenzierung in Sense- bzw. Antisense- Richtung ermöglichen. Das Ampicillin- Resistenz- Gen (β - Lactamase) ist ebenfalls abgebildet. Die Vektorkarte stammt von Addgene und wurde vereinfacht.

CFHR5 und die vier CFHR5 Deletionsmutanten wurden in HEK- Zellen rekombinant exprimiert und mittels Affinitätschromatographie zur Homogenität aufgereinigt.

7.3 Detektion von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten mittels immunologischen Nachweises

CFHR5 und die vier Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} wurden nach der Expression und Aufreinigung mit den monoklonalen Antikörpern mAk- hc- Myc und mAk- CFHR5 detektiert. Die Reaktivität der Antikörper wurde mittels ELISA überprüft. CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten wurden hierzu in den ELISA-

Platten gebunden. Der mAk- hc- Myc Antikörper bindet sowohl an CFHR5, als auch an CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} (Abb. 9A). Der Antikörper bindet an das intakte CFHR5 Protein und an die CFHR5 Deletionsmutanten mit vergleichbarer Intensität (OD: ~0,8). Der mAk- CFHR5 Antikörper (Abb. 9B) bindet an CFHR5 sowie an CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ mit vergleichbarer Intensität (OD: ~0,4). CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} werden nicht vom mAk- CFHR5 Antikörper erkannt, das Bindungssignal ist vergleichbar mit dem BSA Hintergrund (OD_{BSA}: 0,1).

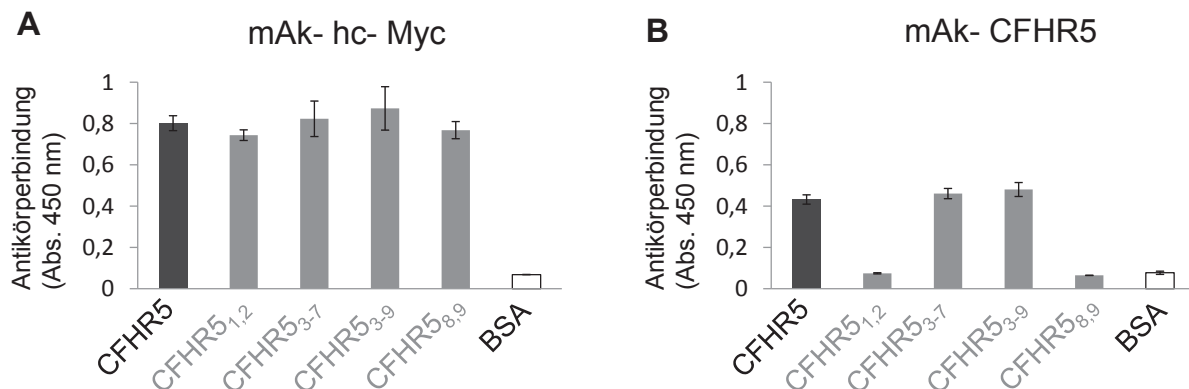


Abb. 9: Detektion von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten durch mAk- hc- Myc und mAk- CFHR5.

Nachdem CFHR5 sowie die CFHR5 Deletionsmutanten (jeweils 50 nM) in einer ELISA- Platte gebunden wurden, folgte das Blocken unspezifischer Bindestellen und die Inkubation der oben genannten monoklonalen Antikörper in 1:2000 Verdünnung. In beiden Fällen wurde *Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP* (Dako, 1:2000) als sekundärer Antikörper verwendet. Die Analyse der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm. Die Bindung an immobilisiertes BSA zeigt den Hintergrund. (A) CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten werden mit vergleichbarer Intensität durch mAk- hc- Myc gebunden (OD: ~0,8). Der BSA Hintergrund ist niedrig (OD_{BSA}: 0,1). (B) CFHR5, CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ werden mit vergleichbarer Intensität durch mAk- CFHR5 gebunden (OD ~0,4). Die Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} werden vom mAk- CFHR5 Antikörper nicht erkannt.

Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Der mAk- hc- Myc Antikörper wird im Folgenden als Standard- Antikörper verwendet, da mAk- hc- Myc sowohl CFHR5 als auch die vier CFHR5 Deletionsmutanten mit vergleichbarer Intensität bindet. Der mAk- CFHR5 Antikörper wird als Kontroll- Antikörper für die Untersuchung von CFHR5, CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ verwendet.

7.4 Detektion von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten im Silbergel und Western Blot

Die rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteine CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten wurden mittels SDS- Gelelektrophorese unter reduzierenden bzw. nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennten Proteine wurden mittels Silberfärbung detektiert (Abb. 10A). Die unter nicht reduzierenden

Bedingungen aufgetrennten Proteine wurden nach dem Transfer auf eine Membran mittels Western Blot nachgewiesen (Abb. 10B). CFHR5 wurde in der Reihe 1 aufgetragen und per Silberfärbung detektiert. Die 75 kDa Bande entspricht CFHR5 in monomerer Form. Die einfach glykosylierte und zweifach glykosylierte Form von CFHR5 lassen sich bei dieser Auftrennung nicht unterscheiden. Kurz unter der 75 kDa CFHR5 Bande ist eine zweite Bande bei ca. 70 kDa, welche BSA entspricht. Auch in den übrigen Reihen ist eine BSA- Bande bei 70 kDa zu erkennen, da BSA bei der Aufreinigung der Proteine mit eluiert wird. Die aufgetrennten CFHR5_{1,2}- Banden haben eine Mobilität von 23 und 18 kDa (Reihe 2). Die Banden entsprechen der glykosylierten (23 kDa) und nicht glykosylierten Form (18 kDa) von CFHR5_{1,2}. CFHR5₃₋₇ wurde in Reihe 3 aufgetrennt und die Proteinbande erscheint bei 50 kDa. CFHR5₃₋₉ wurde in Reihe 4 wurde aufgetrennt. CFHR5₃₋₉ hat eine Mobilität von 65 kDa. Das aufgetrennte CFHR5_{8,9} erscheint im Silbergel bei 25 kDa (Reihe 5). CFHR5 sowie die CFHR5 Deletionsmutanten haben nach der Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen im Silbergel eine geringere Mobilität als ihre berechneten molekularen Massen (Bsp. CFHR5: Silbergel: 75 kDa, Berechnung: 62 bzw. 67 kDa). CFHR5 und CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9} wurden im Silbergel nachgewiesen, die Expression war erfolgreich und die Aufreinigung erfolgte nahezu zur Homogenität der Proteine.

Für den Western Blot wurden die Proteine unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt (Abb. 10B). CFHR5 wurde in Reihe 1 aufgetragen und wird als Bande von 62 bzw. 67 kDa detektiert. Die Bande entspricht der monomeren Form von CFHR5. Die einfach und zweifach glykosylierte Form von CFHR5 lässt sich in dieser Auftrennung nicht unterscheiden. Die höhermolekularen Banden repräsentieren wahrscheinlich CFHR5 Multimere mit Mobilitäten von etwa 130 kDa und über 170 kDa. Die aufgetrennten CFHR5_{1,2}- Banden erscheinen bei 14 und 19 kDa. Die Banden entsprechen CFHR5_{1,2} in glykosylierter (19 kDa) und nicht glykosylierter Form (14 kDa). CFHR5₃₋₇ wurde in Reihe 3 aufgetrennt und die Proteinbande erscheint bei einer Mobilität von 34 kDa. In Reihe 4 erkennt man neben der Monomerbande von CFHR5₃₋₉ bei 48 kDa auch eine weitere deutliche Bande zwischen dem 70 kDa und 100 kDa Marker. Die obere Bande könnte CFHR5₃₋₉ Dimeren mit einer Mobilität von 96 kDa entsprechen. Das aufgetrennte CFHR5_{8,9} zeigt ebenfalls zwei Banden. Die untere liegt bei etwa 14 kDa und zeigt die monomere Form von CFHR5_{8,9}. Die obere Bande befindet sich kurz über dem 25 kDa Marker. Die obere Bande könnte CFHR5_{8,9} Dimere mit einer Mobilität von 28 kDa repräsentieren. Im Western Blot wurde CFHR5 sowohl als monomere Komponente als auch als Multimer detektiert. CFHR5_{1,2} erscheint hier ausschließlich als Monomer. CFHR5₃₋₇ stellt sich ebenfalls ausschließlich als Monomer dar.

Für die Proteine CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} können Monomere und wahrscheinlich auch Dimere im Western Blot detektiert werden. Alle Proteine mit Ausnahme von CFHR5_{8,9} zeigen im Western Blot eine vergleichbare Bandenintensität. Die Bandenintensität von CFHR5_{8,9} ist etwa halb so stark wie die der anderen Proteine.

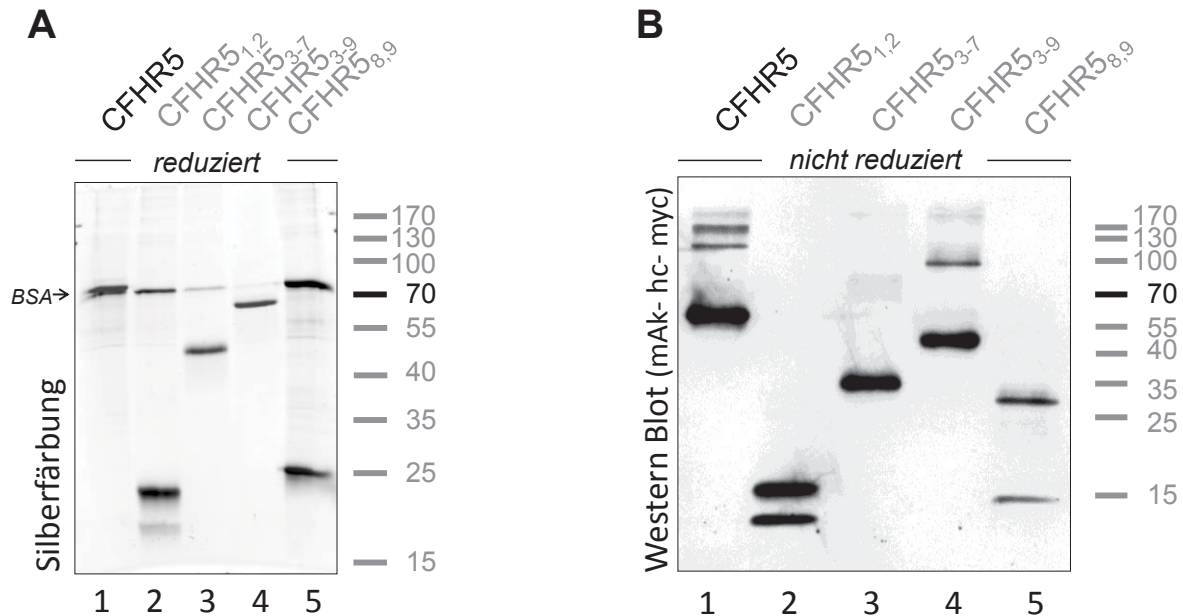


Abb. 10: Darstellung von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten im Silbergel und im Western Blot.

CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten wurden in rekombinanter Form exprimiert und zur Homogenität aufgereinigt. Die Proteine wurden in der SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt und im Silbergel bzw. nach dem Transfer auf eine Membran im Western Blot detektiert. (A) Für die Silberfärbung wurden CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten mit reduzierendem Probenpuffer versetzt. CFHR5 erscheint bei einer Mobilität von 75 kDa (Reihe 1). Einfach und zweifach glykosylierte Variante lassen sich in dieser Auftrennung nicht unterscheiden. CFHR5_{1,2} sieht man in seiner glykosylierten Form bei 23 kDa und in seiner nicht glykosylierten Form bei einer Mobilität von 18 kDa (Reihe 2). CFHR5_{3,7} läuft im Gel bei 50 kDa (Reihe 3) und CFHR5_{3,9} bei 65 kDa (Reihe 4). CFHR5_{8,9} hat eine Mobilität von 25 kDa (Reihe 5). In allen Reihen erkennt man bei 70 kDa noch eine weitere Bande. Sie entspricht BSA, welches bei der Aufreinigung der Proteine mit eluiert wird. (B) Für den Nachweis mittels Westen Blot wurden CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten (jeweils 25 nM) mit nichtreduzierendem Probenpuffer versetzt, mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt, im Semidry- Verfahren auf eine Membran überführt und mit mAk- hc- Myc detektiert. CFHR5 wurde aufgetrennt und die stärkste Bande bei 62 bzw. 67 kDa entspricht CFHR5 Monomeren (Reihe 1). Die einfach und zweifach glykosylierte Variante von CFHR5 sind in dieser Auftrennung nicht zu unterscheiden. Weitere Banden sieht man bei 130 kDa sowie über 170 kDa. Die Banden entsprechen wahrscheinlich CFHR5 Multimeren. CFHR5_{1,2} sieht man in glykosylierter (19 kDa) und nicht glykosylierter (14 kDa) Form (Reihe 2). CFHR5_{3,7} wurde bei 34 kDa detektiert (Reihe 3). In Reihe 4 wurde CFHR5_{3,9} aufgetrennt und zeigt zwei Banden. Die untere bei 48 kDa repräsentiert Monomere von CFHR5_{3,9}. Die obere Bande liegt zwischen 70 und 100 kDa und zeigt wahrscheinlich CFHR5_{3,9} Dimere (96 kDa). Auch aufgetrenntes CFHR5_{8,9} zeigt zwei Banden. Die untere Bande hat eine Mobilität von 14 kDa und entspricht CFHR5_{8,9} Monomeren. Die obere bei 28 kDa und damit doppelter Molekülmasse zeigt wahrscheinlich CFHR5_{8,9} Dimere. Mit Ausnahme von CFHR5_{8,9} stellen sich die Proteine im Western Blot mit gleicher Bandenintensität dar. Die Bandenintensität von CFHR5_{8,9} ist im Western Blot etwa halb so stark wie die der anderen untersuchten Proteine. Die Ergebnisse stehen jeweils für mehr als drei unabhängige Experimente.

7.5 CFHR5 bindet an Zellen

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von CFHR5 mit Faktor H bzw. CFHR1 wurde postuliert, dass CFHR5 an zelluläre Oberflächen bindet. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Bindung von CFHR5 an CHO Zellen und HUVEC untersucht.

7.5.1 CFHR5 bindet an CHO- Zellen

CHO Zellen, eine Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters, wurden für erste Bindungsstudien ausgewählt. Diese Zellen exprimieren keine humanen Komplementregulatoren auf ihrer Oberfläche, welche die Bindung von CFHR5 beeinflussen könnten. CFHR5 wurde mit CHO Zellen inkubiert, die Zellen gewaschen und das zellgebundene CFHR5 mittels Durchflusszytometrie detektiert (Abb. 11). CFHR5 bindet an CHO Zellen. Die Bindung von CFHR5 an CHO Zellen ist dosisabhängig ($MFI_{200\text{ nM}}$: 425; $MFI_{1000\text{ nM}}$: 1156; MFI_P : 220).

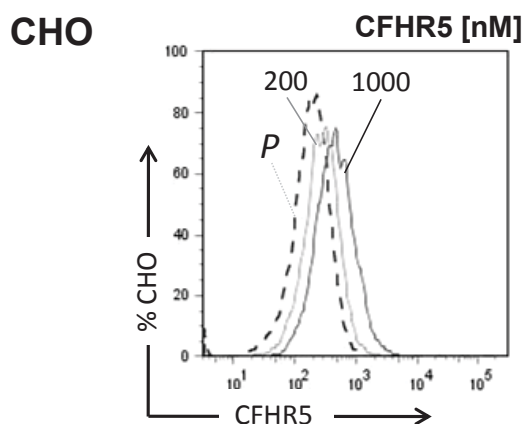


Abb. 11: Bindung von CFHR5 an CHO Zellen.

CFHR5 (200 und 1000 nM) wurde an CHO Zellen gebunden, die Zellen gewaschen und das an CHO Zellen gebundene CFHR5 durchflusszytometrisch mittels mAk- hc- Myc nachgewiesen. Die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) steigt bei Erhöhung der Stoffmengenkonzentration von 200 nM zu 1000 nM CFHR5 an ($MFI_{200\text{ nM}}$: 425; $MFI_{1000\text{ nM}}$: 1156; MFI_P : 220). CFHR5 bindet an CHO Zellen und die Bindung ist dosisabhängig. *P*- Puffer
Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

7.5.2 CFHR5 bindet an HUVEC

Im nächsten Schritt wurde die Bindung von CFHR5 an humane Zellen untersucht. Für diese Bindungsstudien wurden humane Nabelschnurendothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) eingesetzt. Rekombinant exprimiertes CFHR5 wurde hierzu an HUVEC gebunden und das zellgebundene CFHR5 im Western Blot (Abb. 12A) und in der Durchflusszytometrie (Abb. 12B) analysiert. Per Western Blot wurde CFHR5 in monomerer Form bei 62 bzw. 67 kDa detektiert (Abb. 12A). Bei diesem Ansatz sind die einfach und

zweifach glykosylierte Variante von CFHR5 nicht zu unterscheiden. Die schwache Bande bei 130 kDa entspricht CFHR5- Dimeren. Ebenfalls wurden Banden von mehr als 170 kDa detektiert. Diese höhermolekularen Banden entsprechen wahrscheinlich CFHR5- Multimeren, welche aus drei und mehr CFHR5 Molekülen bestehen. CFHR5 bindet an HUVEC. Die Bindung von CFHR5 an HUVEC wurde im zweiten Schritt durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 12B). Auch im durchflusszytometrischen Nachweis bindet CFHR5 an HUVEC. Die Bindung von CFHR5 an HUVEC ist dosisabhängig (MFI₅₀: 470; MFI₂₀₀: 945; MFI₅₀₀: 1281; MFI_P: 45).

HUVEC

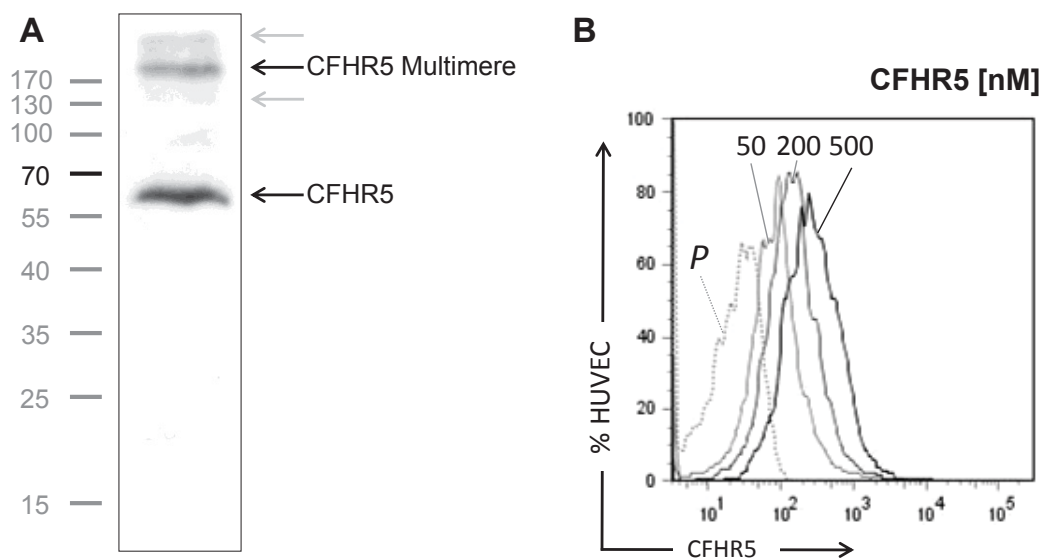


Abb. 12: Bindung von CFHR5 an HUVEC.

(A) Gezeigt ist der Bindungsnachweis von CFHR5 an HUVEC im Western Blot. CFHR5 (300 nM) wurde an HUVEC gebunden. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und das Lysat mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Membran überführt und das gebundene CFHR5 im Western Blot analysiert. CFHR5 Monomere laufen bei 62 bzw. 67 kDa. Die Banden bei 130 kDa und über 170 kDa repräsentieren CFHR5 Multimeren. CFHR5 bindet an HUVEC. (B) CFHR5 (50, 200, 500 nM) wurde an HUVEC gebunden, die Zellen gewaschen und das gebundene CFHR5 durchflusszytometrisch detektiert. Mit zunehmender Stoffmengenkonzentration von CFHR5 steigen die Fluoreszenzintensitäten (MFI₅₀: 470; MFI₂₀₀: 945; MFI₅₀₀: 1281; MFI_P: 45). CFHR5 bindet an HUVEC und die Bindung ist dosisabhängig. *P*- Puffer

(A) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Die Durchflusszytometrie steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente und das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung des mAk- CFHR5 Antikörpers erzielt (Daten nicht gezeigt).

7.6 CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische humane Zellen

Es sollte geklärt werden, ob CFHR5 an modifizierte Zellen bindet. Hierzu wurde die Bindung von CFHR5 an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC untersucht.

7.6.1 Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC mittels Western Blot

CFHR5 wurde an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC gebunden, die Zellen gewaschen und zellgebundenes CFHR5 im Western Blot analysiert (Abb. 13). CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische sowie an nekrotische HUVEC. CFHR5 in monomerer Form wurde in allen Reihen bei 62 kDa bzw. 67 kDa detektiert. Im Weiteren wurden für spätapoptotischen und nekrotischen HUVEC (Reihe 3 und 4) CFHR5 Multimerbanden bei 130 kDa (CFHR5 Dimere) und über 170 kDa detektiert. CFHR5 bindet mit geringer Intensität an intakte HUVEC. Mit moderater Intensität bindet CFHR5 an frühapoptotische HUVEC und mit höchster Intensität an spätapoptotische und an nekrotische humane Endothelzellen.

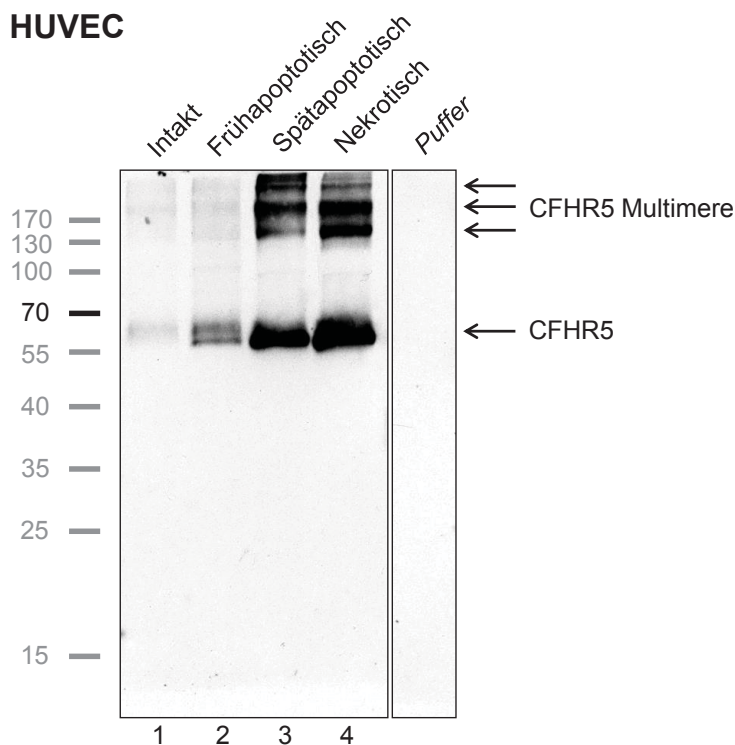


Abb. 13: CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Western Blot.

CFHR5 (300 nM) wurde an intakte, frühapoptotische, spätapoptotische und nekrotische HUVEC gebunden. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert, das Lysat mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran überführt. Gebundenes CFHR5 wurde im Western Blot analysiert. Die Reihen 1-4 zeigen die CFHR5 Bindung an die vier verschiedenen Zellformen der HUVEC. CFHR5 wurde in allen Reihen bei 62 bzw. 67 kDa nachgewiesen. In den Reihen 3 und 4 laufen CFHR5 Multimerbanden bei 130 kDa und über dem 170 kDa Marker. CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC. CFHR5 bindet mit höherer Intensität an spätapoptotische und nekrotische als an intakte und frühapoptotische humane Zellen.

Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

7.6.2 Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC mittels Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt wurde die Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC durchflusszytometrisch analysiert. Da die Western Blot Experimente zeigten, dass CFHR5 mit vergleichbarer Intensität an spätapoptotische und nekrotische HUVEC bindet, wurden für die durchflusszytometrische Untersuchung nekrotische Zellen ausgewählt und die Bindung von CFHR5 an spätapoptotische Zellen in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. CFHR5 wurde an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC gebunden, die Zellen gewaschen und das zellgebundene CFHR5 detektiert. CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC. Die Bindung von CFHR5 an die verschiedenen Zellformen der HUVEC ist jeweils dosisabhängig (Abb. 14). CFHR5 bindet mit unterschiedlicher Intensität an die untersuchten Zellformen (Tabelle 1). CFHR5 bindet mit geringer Intensität an intakte HUVEC (MFI: 363,8) und etwas stärker an frühapoptotische HUVEC (MFI: 381,7). Mit höchster Intensität, i.e. etwa 50-fach höherer Mittlerer Fluoreszenzintensität, bindet CFHR5 an nekrotische HUVEC (MFI: 19936,0).

HUVEC

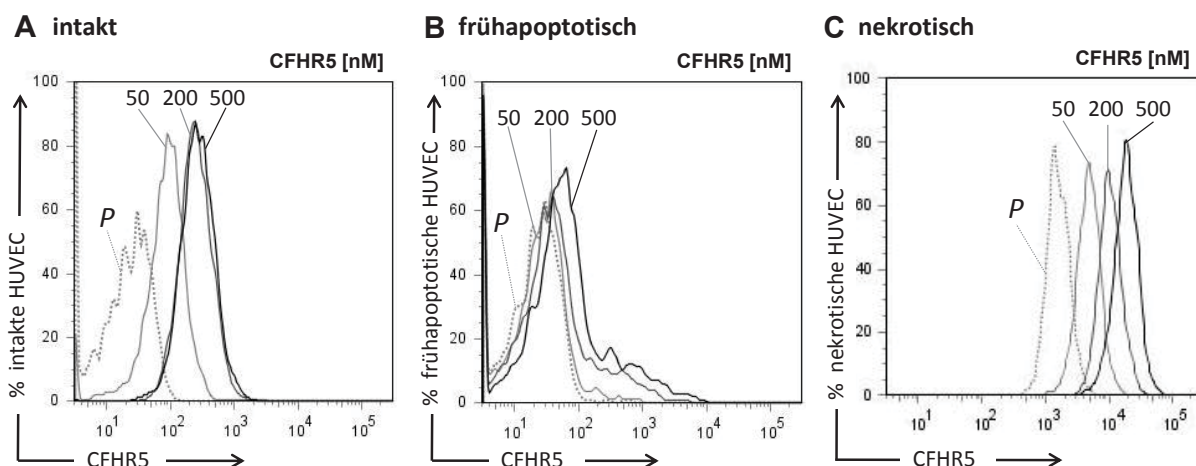


Abb. 14: CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie.

CFHR5 (50, 200, 500 nM) wurde an intakte (A), frühapoptotische (B) und nekrotische (C) HUVEC gebunden. Die Zellen wurden gewaschen und gebundenes CFHR5 durchflusszytometrisch detektiert. CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC und die Bindung ist dosisabhängig. CFHR5 bindet mit höherer Intensität an nekrotische HUVEC als an intakte und frühapoptotische. P- Puffer

(A) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente und das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung des mAk- CFHR5 Antikörpers erzielt (Daten nicht gezeigt). (B) Das Ergebnis steht repräsentativ für unabhängige drei Experimente. (C) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente und das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung des mAk- CFHR5 Antikörpers erzielt (Daten nicht gezeigt).

		Zellformen		
		Intakt	Frühapoptotisch	Nekrotisch
MFI	CFHR5	363,8	381,7	19936,0
	Puffer	22,7	26,3	1686,0

Tabelle 1: CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC.
Gezeigt sind die ermittelten Mittleren Fluoreszenzintensitäten bei 500 nM CFHR5.

7.6.3 Nachweis der Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC mittels Fluoreszenzmikroskopie

Nach der durchflusszytometrischen Analyse wurden intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC auf einen Objektträger gebracht, eingebettet und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 15). Die Fluoreszenzmikroskopie- Aufnahmen zeigen die Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC in roter Fluoreszenz (Reihe 1) und die Annexin V- Färbung in blauer Fluoreszenz (Reihe 2). Desweiteren sind die Durchlichtaufnahmen (Reihe 3) und die Überlagerung aller drei Einstellungen (Reihe 4) abgebildet. Die intakten HUVEC (Abb. 15A) haben eine runde Zellkontur und zeigen keine Anfärbung durch Annexin V, beides Zeichen einer unbeschädigten Zellmembran. Die intakten Zellen zeigen nur eine punktuelle rote Fluoreszenz. CFHR5 bindet mit geringer Intensität an intakte HUVEC. Frühapoptotische HUVEC (Abb. 15B) zeigen im Durchlicht eine Zellschrumpfung und im Laserkanal eine deutliche Annexin V- Anfärbung der Zellmembran. Zellschrumpfung und Annexin V- Färbungen sind Zeichen der Apoptose. Auch hier zeigt sich lediglich eine geringe rote Fluoreszenz der Zellmembran. CFHR5 bindet mit geringer Intensität an frühapoptotische HUVEC. Die nekrotischen HUVEC (Abb. 15C) sind mäßig geschwollen und mit Annexin V gefärbt. Die nekrotischen HUVEC und vor allem die Zellmembran der nekrotischen HUVEC fluoresziert in kräftigem Rot. CFHR5 bindet mit höchster Intensität an nekrotische HUVEC.

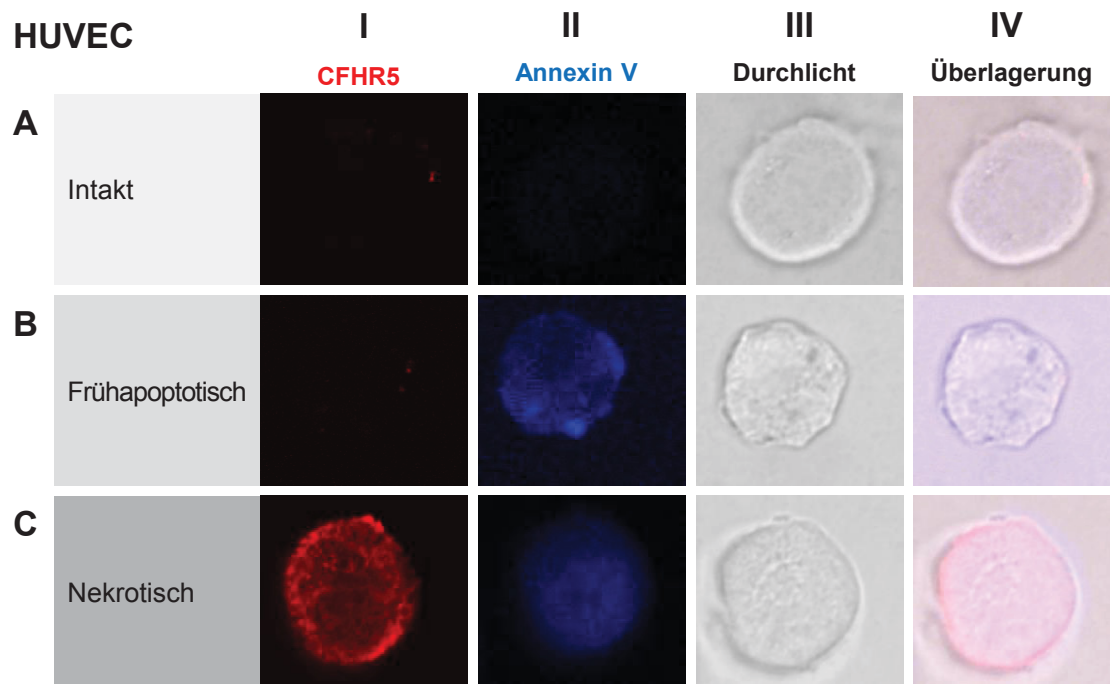


Abb. 15: Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Intakte (A), frühapoptotische (B) und nekrotische HUVEC (C) wurden nach der durchflusszytometrischen Analyse auf Objektträger gebracht und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Reihe 1 zeigt die Bindung von CFHR5 an die HUVEC in roter Fluoreszenz, Reihe 2 die blaue Annexin V- Färbung. Reihe 3 stellt die Durchlichtaufnahme dar und Reihe 4 die Überlagerung aller drei Einstellungen. (A) Die intakten Zellen zeigen eine erhaltene runde Zellform, fehlende Annexin V- Färbung und eine punktuelle rote Fluoreszenz. CFHR5 bindet mit geringer Intensität an intakte HUVEC. (B) Die geschrumpften frühapoptotischen Zellen zeigen eine deutliche Annexin V- Färbung der Zellmembran und ebenfalls eine punktuelle rote Fluoreszenz. CFHR5 bindet mit geringer Intensität an frühapoptotische HUVEC. (C) Die nekrotischen HUVEC sind mäßig geschwollen und zeigen eine Färbung durch Annexin V. CFHR5 bindet mit wesentlich höherer Intensität an nekrotische HUVEC als an intakte und frühapoptotische.

7.7 Lokalisation der Oberflächenbindedomäne von CFHR5

Um die Oberflächenbindedomäne von CFHR5 zu lokalisieren, wurden die vier CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} eingesetzt und ihre Bindung an Zelloberflächen untersucht.

7.7.1 Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an CHO Zellen

Die CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 zum Vergleich wurden mit CHO Zellen inkubiert, die Zellen gewaschen und gebundenes Protein jeweils mittels Durchflusszytometrie detektiert. CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an CHO Zellen und die Bindung ist dosisabhängig (Abb. 16A, Tabelle 2). CFHR5 (Abb. 16B) bindet an CHO Zellen und die Bindung ist dosisabhängig. CFHR5 (MFI₁₀₀₀: 1266,4) bindet mit etwa doppelter Intensität an CHO Zellen im Vergleich zu den beiden CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ (MFI₁₀₀₀: 826,0) und CFHR5₃₋₉ (MFI₁₀₀₀: 672,1). CFHR5₃₋₇ bindet hier etwas stärker als CFHR5₃₋₉ an die CHO

Zellen. Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} dahingegen binden nicht an CHO Zellen. CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} zeigen keinen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten bei zunehmender Stoffmengenkonzentration. Die für die Bindung von CFHR5 an CHO Zellen verantwortlichen Domänen sind im mittleren Bereich des Proteins, i.e. in SCR3 bis SCR7 lokalisiert. SCR1 und SCR2 sowie SCR8 und SCR9 von CFHR5 tragen nicht zur Bindung an CHO Zellen bei.

CHO

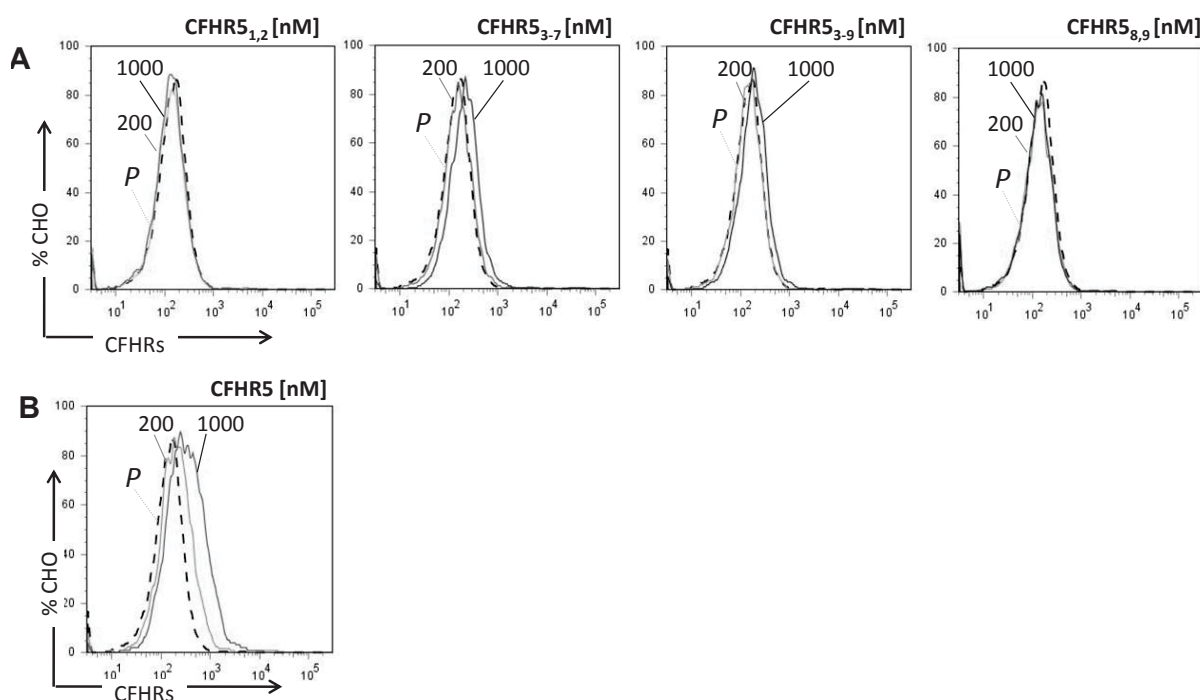


Abb. 16: Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an CHO Zellen.

Die CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 (200, 1000 nM) wurden mit CHO Zellen inkubiert, die Zellen gewaschen und gebundenes Protein mittel Durchflusszytometrie untersucht. (A) CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an CHO Zellen und die Bindung ist dosisabhängig. CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an CHO Zellen. (B) CFHR5 bindet an CHO Zellen und die Bindung ist dosisabhängig. P-Puffer

Die Ergebnisse stehen repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

	CFHR5	CFHR5 _{1,2}	CFHR5 ₃₋₇	CFHR5 ₃₋₉	CFHR5 _{8,9}	Puffer
MFI	1266,4	202,2	826,0	672,1	189,2	194,8

Tabelle 2: Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an CHO Zellen.

Gezeigt sind die ermittelten MFI bei 1000 nM Protein. CFHR5 bindet mit etwa doppelter Intensität an die CHO Zellen (MFI₁₀₀₀: 1266,4) im Vergleich zu den CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ (MFI₁₀₀₀: 826,0) und CFHR5₃₋₉ (MFI₁₀₀₀: 672,1). CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an CHO Zellen.

7.7.2 Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC

Im nächsten Schritt wurden die CFHR5 Deletionsmutanten an humane Zellen gebunden. Es sollte geprüft werden, welche Region von CFHR5 die Bindung an intakte und modifizierte humane Zellen vermittelt. Wiederum wurden HUVEC für die Bindungsstudien an humanen Zellen gewählt.

7.7.2.1 Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte und modifizierte HUVEC, Nachweis mittels Western Blot

Die CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 wurden mit intakten, früh- und spätapoptotischen sowie nekrotischen HUVEC inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurde gebundenes Protein mittels Western Blot untersucht. Nebeneinander aufgetragen wurden jeweils die Pufferkontrolle (Reihe 1), das an die HUVEC gebundene CFHR5 (Reihe 2) sowie die gebundenen CFHR5 Deletionsmutanten (Reihen 3- 6, Abb. 17). Für alle untersuchten Formen der HUVEC konnten CFHR5 Monomerbanden bei 62 bzw. 67 kDa, sowie höhermolekulare Multimerbanden nachgewiesen werden (Reihe 2). Die einfach und zweifach glykosylierte Variante von CFHR5 war bei diesen Auftrennungen nicht zu unterscheiden. CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC und bindet die untersuchten Zellformen jeweils mit höherer Intensität als die CFHR5 Deletionsmutanten. An HUVEC gebundenes CFHR5_{1,2} wurde in Reihe 3 aufgetragen. CFHR5_{1,2} bindet weder an intakte noch an modifizierte HUVEC. Gebundenes CFHR5_{1,2} konnte nicht detektiert werden. CFHR5_{3,7} (Reihe 4) bindet an alle untersuchten Zellformen der HUVEC. Zellgebundenes CFHR5_{3,9} (Reihe 5) wurde ebenfalls bei allen Zellformen der HUVEC nachgewiesen. Für das an HUVEC gebundene CFHR5_{8,9} in Reihe 6 muss das geringere Signal von CFHR5_{8,9} im Western Blot beachten werden. Auch bei längerem Entwickeln der Filme als hier abgebildet, konnte keine Bindung von CFHR5_{8,9} an intakte und frühapoptotische HUVEC nachgewiesen werden. Im dargestellten Blot erscheinen schwache Banden von CFHR5_{8,9} für spätapoptotische und nekrotische HUVEC bei 14 und 28 kDa.

CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{3,7} und CFHR5_{3,9} binden an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC. CFHR5_{8,9} bindet an spätapoptotische und nekrotische HUVEC. Dabei binden die CFHR5 Deletionsmutanten wie CFHR5 mit unterschiedlicher Intensität an intakte und modifizierte HUVEC. Ebenso wie CFHR5 binden auch die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{3,7} (Reihe 4) und CFHR5_{3,9} (Reihe 5) mit höherer Intensität an spätapoptotischen und nekrotischen HUVEC als an intakte und frühapoptotische

Zellen. Wie auch der Bindungsnachweis an CHO Zellen, zeigt der Western Blot der HUVEC, dass wahrscheinlich die Mitteldomäne die Oberflächenbindung von CFHR5 vermittelt.

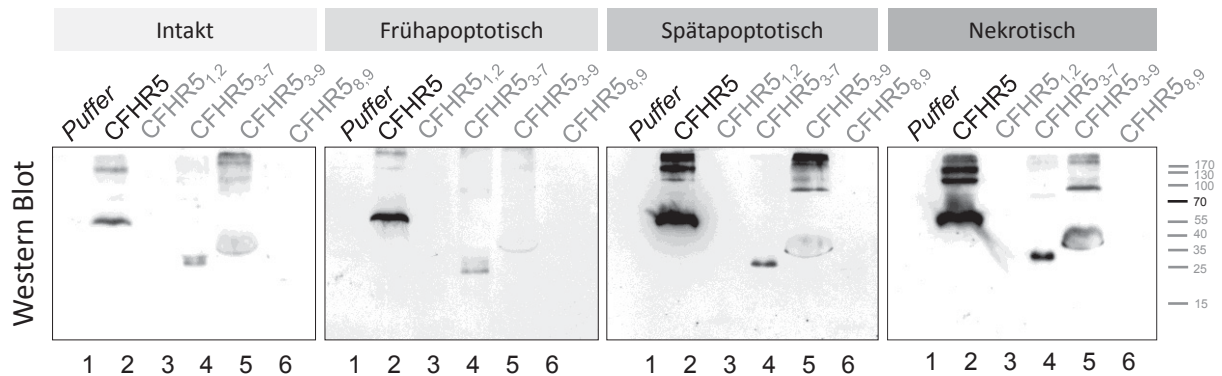


Abb. 17: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC, Western Blot.

CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten (jeweils 300 nM) wurden an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC gebunden. Die Zellen wurden gewaschen, lysiert und das Lysat mittels SDS- Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Membran wurde das gebundene Protein mittels Western Blot mit dem mAk- hc- Myc Antikörper detektiert. CFHR5 (Reihe 2) und die Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ (Reihe 4) und CFHR5₃₋₉ (Reihe 5) binden an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC. CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden mit höherer Intensität an spätapoptotische und nekrotische HUVEC als an intakte und frühapoptotische HUVEC. CFHR5_{1,2} (Reihe 3) bindet nicht an HUVEC. Der Deletionsmutant CFHR5_{8,9} (Reihe 6) bindet an spätapoptotische und nekrotische HUVEC. Die Pufferkontrolle ist jeweils negativ (Reihe 1). Die Ergebnisse stehen repräsentativ für jeweils mindestens drei unabhängige Experimente.

7.7.2.2 Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte und modifizierte HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie

Die Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 an humane Zellen wurde im Weiteren mittels Durchflusszytometrie untersucht. Der Western Blot lieferte keinen Hinweis, dass SCR1 und SCR2 von CFHR5 an der Bindung an HUVEC beteiligt sind. Deshalb wurde auf die Untersuchung des CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} mittels Durchflusszytometrie verzichtet. Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob sowohl Mittelregion als auch C- Terminus oder exklusive eine der beiden Domänen von CFHR5 die Oberflächenbindung vermittelt. Der Western Blot zeigte desweiteren, dass CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten mit vergleichbarer Intensität an spätapoptotische und nekrotische HUVEC binden. Für die Durchflusszytometrie wurden nekrotische HUVEC ausgewählt und die Bindung der Proteine an spätapoptotische HUVEC in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} und CFHR5 wurden mit intakten (A), frühapoptotischen (B) und nekrotischen (C) HUVEC inkubiert, die Zellen gewaschen und gebundenes Protein mittels Durchflusszytometrie detektiert. CFHR5 bindet an

intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC und CFHR5 bindet dosisabhängig an die verschiedenen Zellformen der HUVEC (Abb. 18, Reihe I). Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} binden an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC (Reihe II-IV). Die Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten ist ebenfalls jeweils dosisabhängig. Die CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 binden an die verschiedenen Zellformen, i.e. intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, mit unterschiedlicher Intensität. CFHR5 bindet mit höherer Intensität an nekrotische HUVEC als an intakte und frühapoptotische HUVEC. Das Gleiche erkennt man für die untersuchten CFHR5 Deletionsmutanten. Die gemessenen Mittleren Fluoreszenzintensitäten verdeutlichen die Beobachtungen (Tabelle 3; $MFI_{\text{intakt/ frühapoptotisch}} < MFI_{\text{nekrotisch}}$). Desweiteren binden die CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 die HUVEC mit unterschiedlicher Intensität. CFHR5 bindet mit höherer Intensität als die CFHR5 Deletionsmutanten an die HUVEC. Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₇ bindet jeweils mit deutlich höherer Intensität, i.e. 2- bis 3- fach höherer Mittlerer Fluoreszenzintensität, an die HUVEC als der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5_{8,9}. Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₉, welcher sowohl die Domänen von CFHR5₃₋₇ als auch von CFHR5_{8,9} besitzt, bindet unter den CFHR5 Deletionsmutanten mit höchster Intensität an die HUVEC.

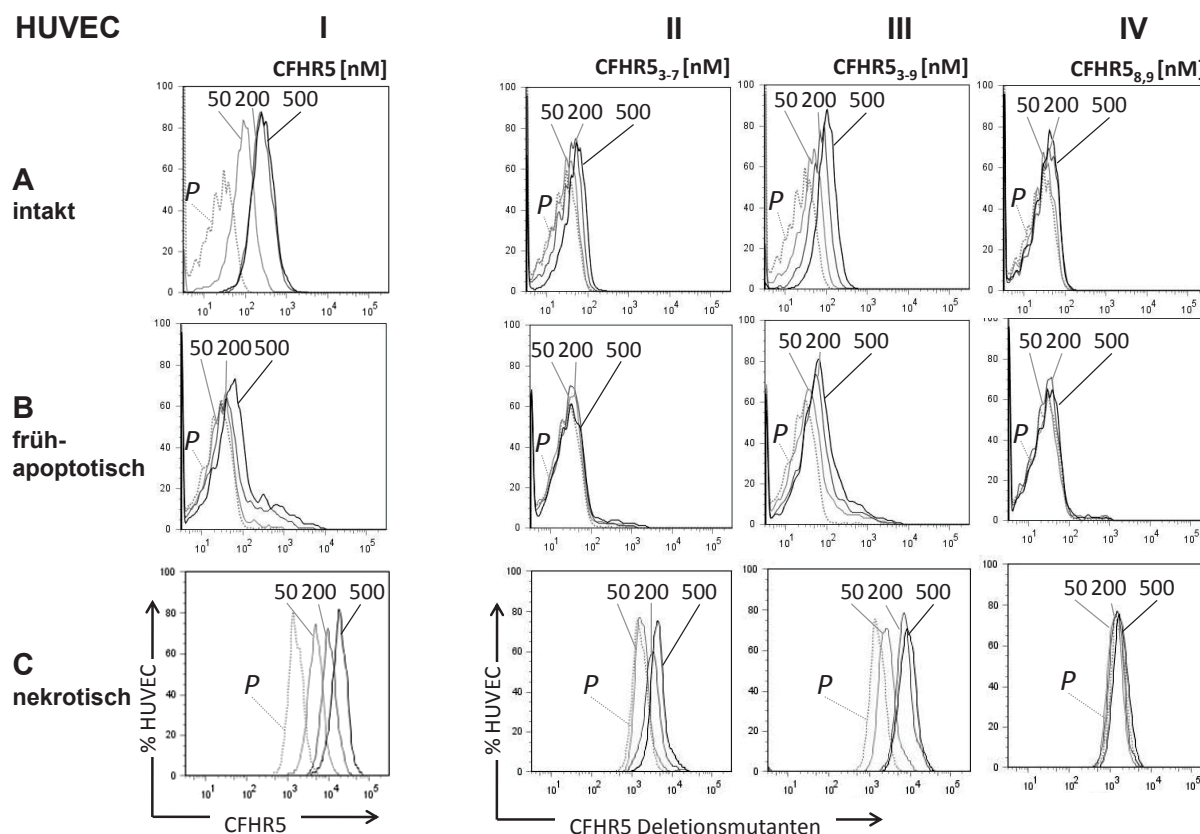


Abb. 18: Bindung von CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie.

CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} (50, 200, 500 nM) wurden mit intakten (A), frühapoptotischen (B) und nekrotischen (C) HUVEC inkubiert, die Zellen gewaschen und gebundenes Protein durchflusszytometrisch analysiert. CFHR5 (Reihe I) und die untersuchten CFHR5 Deletionsmutanten (Reihe II-IV) binden an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC. Die Bindung ist jeweils dosisabhängig. CFHR5 und die untersuchten CFHR5 Deletionsmutanten binden mit höherer Intensität an nekrotische HUVEC als an intakte und frühapoptotische HUVEC. Die Bindungskurven für nekrotische HUVEC liegen bei höheren Fluoreszenzintensitäten. *P*- Puffer

(A) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente und das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung des mAk- CFHR5 Antikörpers erzielt (Daten nicht gezeigt). (B) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (C) Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängige Experimente und das gleiche Ergebnis wurde unter Verwendung des mAk- CFHR5 Antikörpers erzielt (Daten nicht gezeigt).

		Zellformen		
		Intakt	Frühapoptotisch	Nekrotisch
MFI	CFHR5	363,8	381,7	19936,0
	CFHR5 ₃₋₇	119,4	91,2	5069,7
	CFHR5 ₃₋₉	121,5	289,5	9814,2
	CFHR5 _{8,9}	33,4	41,7	2433,2
	Puffer	22,7	36,3	1686,0

Tabelle 3: Bindung von CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC.

Gezeigt sind die ermittelten MFI bei 500 nM Protein. CFHR5 und die CFHR5 Deletionsmutanten binden mit höchster Intensität an nekrotische HUVEC. Die Bindungsintensität für intakte und frühapoptotische HUVEC ist geringer. CFHR5 bindet mit höherer Intensität an HUVEC als die untersuchten CFHR5 Deletionsmutanten. CFHR5₃₋₉ bindet etwas stärker als CFHR5₃₋₇. CFHR5_{8,9} bindet vor allem an nekrotische HUVEC.

7.7.2.3 *Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie*

Nach der durchflusszytometrischen Analyse wurden intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC auf einen Objektträger gebracht, eingebettet und die Bindung von CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Daten für die Aufnahmen der intakten und frühapoptotischen HUVEC sind nicht gezeigt. Aufgrund der geringeren Proteinbindung an die intakten und frühapoptotischen Zellen konnte dabei nur für CFHR5 eine Bindung an die Zellen detektiert werden. Hier dargestellt ist die Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} und CFHR5 an nekrotische HUVEC. Die Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten und CFHR5 ist in roter Fluoreszenz gezeigt (Abb. 19, Reihe I) und die Annexin V- Färbung in blauer Fluoreszenz (Reihe II). Desweiteren sind die Durchlichtaufnahmen (Reihe III) und die Überlagerung aller drei Einstellungen (Reihe IV) dargestellt. Die HUVEC haben infolge der Nekrose ihre runde Zellkontur verloren, sind mäßig geschwollen und zeigen eine deutliche Färbung durch Annexin V (Reihe II-IV). CFHR5, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} binden an nekrotische HUVEC (rote Fluoreszenz, Reihe I). Dabei bindet CFHR5 mit höchster Intensität an die nekrotischen HUVEC. Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₇ bindet mit höherer Intensität als der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5_{8,9}. Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₉, welcher die Domänen von SCR3 bis SCR7 sowie SCR8 und SCR9 besitzt, bindet mit höchster Intensität unter den CFHR5 Deletionsmutanten an die nekrotischen HUVEC.

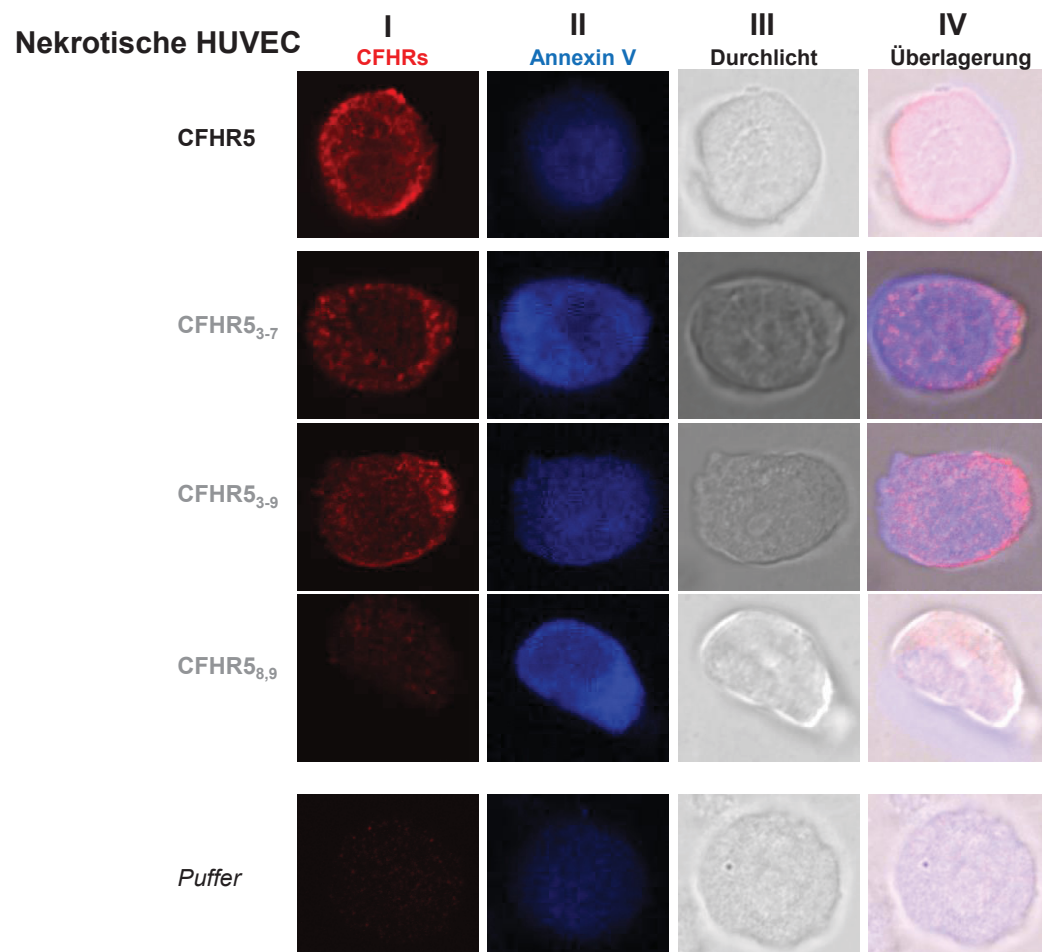


Abb. 19: Die CFHR5 Deletionsmutanten binden an nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Die mit CFHR5 bzw. den CFHR5 Deletionsmutanten inkubierten nekrotischen HUVEC wurden nach der durchflusszytometrischen Analyse auf Objektträger gebracht und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Reihe I zeigt die Bindung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten an die HUVEC in roter Fluoreszenz, Reihe II die blaue Annexin V- Färbung. Reihe III stellt die Durchlichtaufnahmen dar und Reihe IV die Überlagerung aller drei Einstellungen. Die HUVEC sind infolge der Nekrose mäßig geschwollen, entrundet und zeigen eine Färbung durch Annexin V (Reihe II-IV). CFHR5 bindet mit höherer Intensität als die CFHR5 Deletionsmutanten an nekrotische HUVEC. CFHR5₃₋₉ bindet mit etwas höherer Intensität als CFHR5₃₋₇ an die HUVEC. CFHR5_{8,9} bindet mit geringer Intensität an nekrotische HUVEC.

7.8 Heparin, ein Ligand für CFHR5

Erste Untersuchungen durch McRae et al. (2005) zeigten, dass CFHR5 an Heparin bindet und dass die Mittelregion, i.e. SCR5 bis SCR7, von CFHR5 eine Bindedomäne darstellt. Aufgrund der Sequenzhomologie zu Faktor H (Goicoechea de Jorge et al. 2013) sind jedoch sowohl die Mittelregion als auch der C- Terminus von CFHR5 potentielle Ligandeninteraktionsdomänen des Proteins. Um die Binderegion genauer einzugrenzen und die Existenz einer oder zweier Binderegionen darzustellen, wurde die Bindung von CFHR5 und der CFHR5 Deletionsmutanten an immobilisiertes Heparin untersucht. Heparin wurde in ELISA- Platten immobilisiert, CFHR5, CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9}

gebunden und das gebundene CFHR5 bzw. die gebundenen CFHR5 Deletionsmutanten anschließend detektiert (Abb. 20). CFHR5 bindet mit höchster Intensität an Heparin (OD: 1,1). CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden ebenfalls an immobilisiertes Heparin. Beide Deletionsmutanten binden Heparin mit vergleichbarer Intensität (OD₃₋₇: 0,48; OD₃₋₉: 0,53). Die Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} dahingegen binden nicht an Heparin, die Bindungsintensität gleicht dem Puffer- Hintergrund (OD_{1,2}: 0,29; OD_{8,9}: 0,24; OD_P: 0,24).

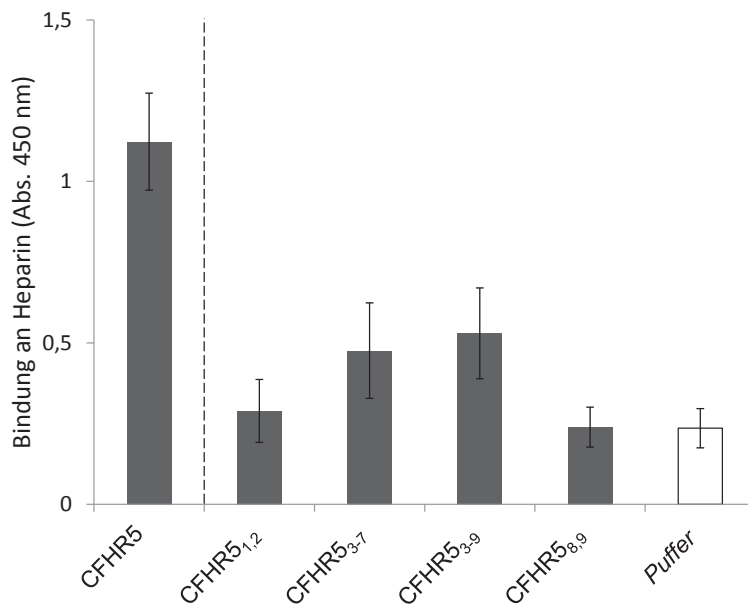


Abb. 20: Bindung von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten an Heparin.

Heparin (*Heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa*) wurde in ELISA-Platten immobilisiert, CFHR5 und CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9} (jeweils 50 nM) hinzugefügt und gebundenes Protein detektiert. CFHR5 bindet an Heparin (OD: 1,1). CFHR5 bindet Heparin mit höherer Intensität als die Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ (OD: 0,48) und CFHR5₃₋₉ (OD: 0,53). CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an das immobilisierte Heparin. Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

7.9 CFHR5 bindet C3- Aktivierungsfragmente

Das Wildtyp CFHR5 Protein ist ein Komplementaktivator (Chen et al. 2015) und bindet C3- Aktivierungsfragmente (Goicoechea de Jorge et al. 2013). Im Folgenden sollte geprüft werden, welche C3- Aktivierungsfragmenten CFHR5 bevorzugt bindet und welche Domänen von CFHR5 die Bindung an diese vermitteln. Hierzu wurde die Bindung von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten an C3b und die C3b Fragmente iC3b, C3c und C3d untersucht.

7.9.1 Bindung von CFHR5 an C3- Aktivierungsfragmente

Zunächst wurde die Bindung von CFHR5 an die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d (Abb. 21A) untersucht. C3b, iC3b, C3c und C3d wurden in ELISA-Platten immobilisiert. CFHR5 wurde hinzugegeben und nach dem Waschen wurde das gebundene CFHR5 detektiert. Als Kontrolle diente immobilisierte Gelantine, welche mit CFHR5

inkubiert wurde, sowie die Inkubation der immobilisierten C3- Moleküle mit Puffer. CFHR5 bindet an C3b, iC3b, C3c und C3d (Abb. 21B). CFHR5 bindet mit höchster Intensität an C3d (OD: 1,3). Mit etwas geringerer Intensität bindet CFHR5 an C3b (OD: 1,0) und iC3b (OD: 0,9). CFHR5 bindet C3c mit niedrigster Intensität unter den untersuchten C3- Fragmenten (OD: 0,7).

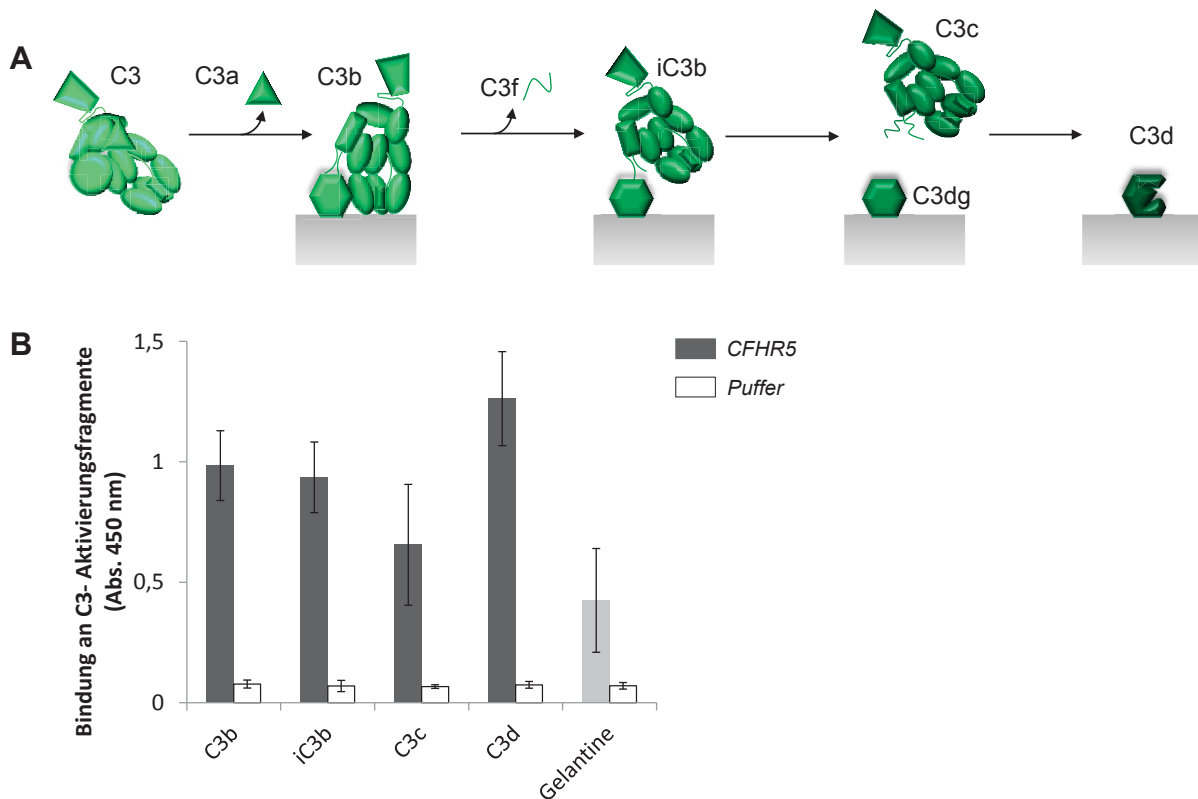


Abb. 21: CFHR5 bindet C3- Aktivierungsfragmente.

(A) Modifizierte Darstellung der Spaltung von C3, nach Janssen et al. (2006). (B) Bindung von CFHR5 an C3b, iC3b, C3c und C3d. Die Moleküle C3b, iC3b, C3c und C3d sowie Gelantine (jeweils 50 nM) wurden in ELISA-Platten immobilisiert. CFHR5 (50 nM) oder Puffer wurde nach dem Blocken hinzugefügt und gebundenes CFHR5 mit dem mAκ- hc- Myc Antikörper detektiert. CFHR5 bindet an C3b, iC3b, C3c und C3d. CFHR5 bindet mit höchster Intensität an C3d (OD: 1,3), mit moderater Intensität an C3b (OD: 1,0) und iC3b (OD: 0,9) und mit geringer Intensität an C3c (OD: 0,7). Der Puffer- Hintergrund ist niedrig (OD: ~0,1).

Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

7.9.2 Lokalisation der Bindedomäne von CFHR5 für C3- Aktivierungsfragmente

Im Anschluss wurde die für die Bindung an die C3- Aktivierungsfragmente zuständige Region von CFHR5 ermittelt. Hierzu wurden wiederum C3b, iC3b, C3c und C3d in ELISA-Platten immobilisiert. Nun wurden die CFHR5 Deletionsmutanten hinzugegeben und gebundenes Protein detektiert. Als Kontrolle diente immobilisierte Gelantine, welche mit den CFHR5 Deletionsmutanten inkubiert wurde, sowie die Inkubation der immobilisierten C3- Moleküle mit Puffer. CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an die C3- Aktivierungsfragmente

(Abb. 22). CFHR5₃₋₇ bindet mit vergleichbarer Intensität an C3b, iC3b und C3c (OD: ~0,3). Mit höchster Intensität bindet CFHR5₃₋₇ an C3d (OD: 0,9). CFHR5₃₋₉ bindet ebenfalls mit höherer Intensität an C3d (OD: 0,7) als an C3b, iC3b und C3c (OD: ~0,5). Die beiden CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ zeigen ein ähnliches Muster wie CFHR5 für die Bindung an C3b, iC3b, C3c und C3d (7.9.1). CFHR5₃₋₇ bindet dabei mit höherer Intensität an C3d als CFHR5₃₋₉. CFHR5₃₋₉ bindet dahingegen C3b, iC3b und C3c mit etwas höherer Intensität als CFHR5₃₋₇. CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an die C3- Aktivierungsfragmente. Die für CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} erhaltenen Signale sind mit der Gelatine- Kontrolle vergleichbar (OD: ~0,1).

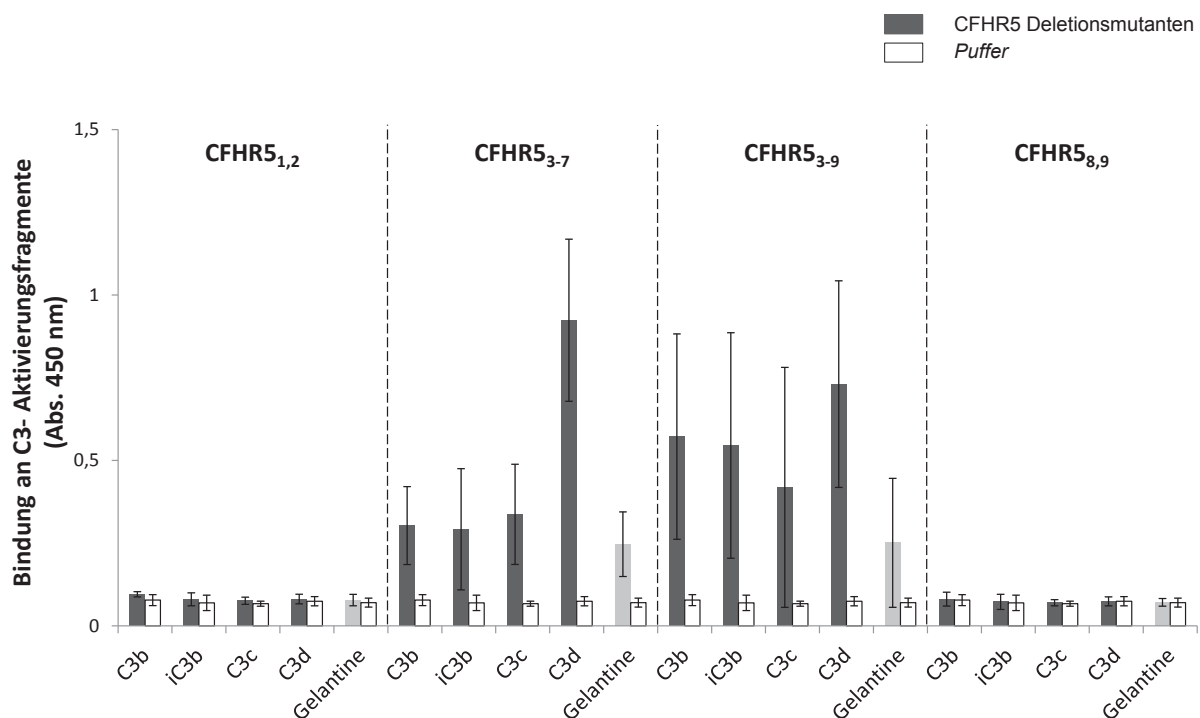


Abb. 22: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an C3- Aktivierungsfragmente.

C3b, iC3b, C3c und C3d sowie Gelatine (jeweils 50 nM) wurden in ELISA- Platten immobilisiert. CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9} (jeweils 50 nM) oder Puffer wurde nach dem Blocken unspezifischer Bindestellen hinzugefügt und gebundenes Protein mit mAk- hc- Myc detektiert. CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an die untersuchten C3- Aktivierungsfragmente. Sowohl CFHR5₃₋₇ als auch CFHR5₃₋₉ binden stärker an C3d als an C3b, iC3b und C3c. Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an die C3- Aktivierungsfragmente. Der Puffer- Hintergrund ist niedrig (OD: ~0,1). Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

7.10 CFHR5 bindet an Properdin

Das 'Jena' Hybridprotein bindet Properdin und aktiviert das Komplementsystem auf Ebene der C3- Konvertase (Chen et al. 2014). Davon ausgehend, dass auch das Wildtyp CFHR5 Protein einen aktivierenden Effekt auf Zelloberflächen besitzt, wurde die Interaktion von CFHR5 mit dem einzig bekannten Komplement- Aktivator Properdin untersucht.

7.10.1 Bindung von CFHR5 an Properdin

Properdin wurden in ELISA- Platten immobilisiert. CFHR5 wurde hinzugegeben und gebundenes CFHR5 detektiert. Als Kontrolle diente immobilisierte Gelantine, welche mit CFHR5 inkubiert wurde, sowie die Inkubation von Properdin mit Puffer. CFHR5 bindet den Komplement- Aktivator Properdin ($OD_{\text{Properdin}}: 1,2$; $OD_{\text{Gelantine}}: 0,4$; $OD_{\text{Puffer}}: \sim 0,1$).

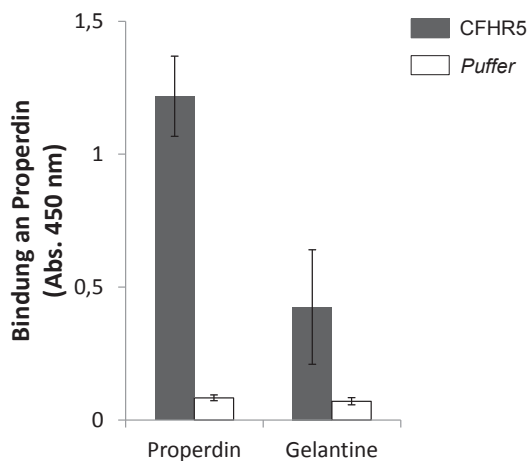


Abb. 23: CFHR5 bindet Properdin.

Properdin und Gelatine (jeweils 50 nM) wurden in ELISA-Platten immobilisiert. CFHR5 (50 nM) oder Puffer wurde nach dem Blocken unspezifischer Bindestellen hinzugefügt und gebundenes CFHR5 mit mAk- hc- Myc detektiert. CFHR5 bindet an Properdin ($OD: 1,2$). CFHR5 bindet Properdin mit höherer Intensität als die Gelatine- Kontrolle ($OD_{\text{Properdin}}: 1,2$; $OD_{\text{Gelatine}}: 0,4$). Der Puffer- Hintergrund ist niedrig ($OD: \sim 0,1$).

Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

7.10.2 Lokalisation der Properdin- Bindungsdomäne von CFHR5

Um die für die Bindung an Properdin zuständige Region von CFHR5 zu ermitteln, wurden die CFHR5 Deletionsmutanten eingesetzt. Properdin wurde in ELISA- Platten immobilisiert, die CFHR5 Deletionsmutanten hinzugegeben und gebundenes Protein detektiert (Abb. 24). Die Deletionsmutanten CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an Properdin. CFHR5₃₋₇ (OD: 0,9) bindet Properdin mit höherer Intensität als CFHR5₃₋₉ (OD: 0,7). Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden hingegen nicht an Properdin. Das Signal für die Bindung von CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} an Properdin ist gering (OD: ~0,1) und vergleichbar mit der Gelatine- Kontrolle (OD: ~0,1).

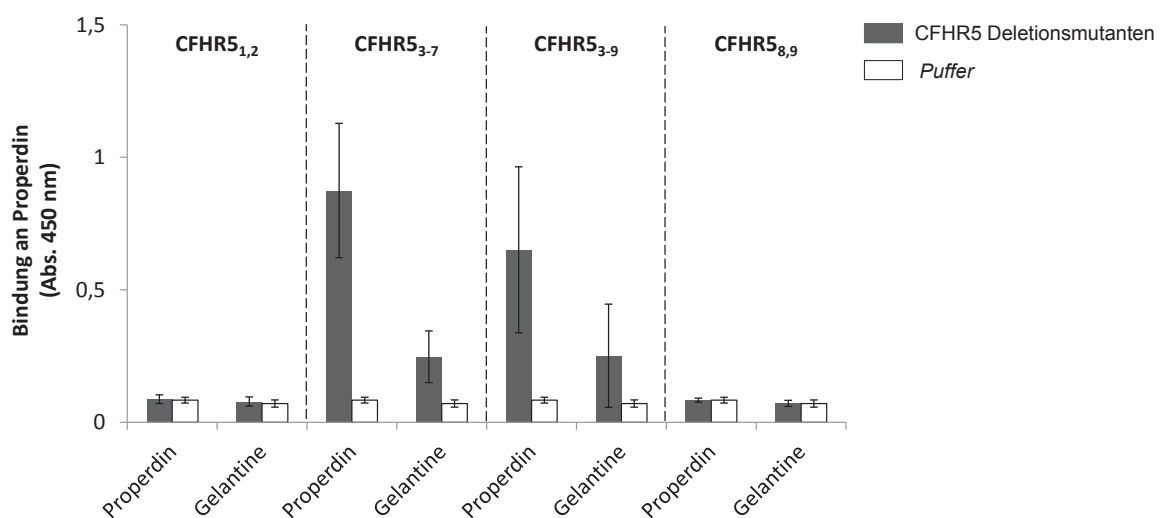


Abb. 24: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an Properdin.

Properdin und Gelatine (jeweils 50 nM) wurden in ELISA-Platten immobilisiert. CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇, CFHR5₃₋₉ sowie CFHR5_{8,9} (jeweils 50 nM) oder Puffer wurde nach dem Blocken unspezifischer Bindestellen hinzugefügt und gebundenes Protein mit mAk- hc- Myc detektiert. CFHR5₃₋₇ und CFHR5₃₋₉ binden an Properdin. CFHR5₃₋₇ (OD: 0,9) bindet mit höherer Intensität an Properdin als CFHR5₃₋₉ (OD: 0,7). Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5_{8,9} binden nicht an Properdin. Der Puffer- Hintergrund ist niedrig (OD: ~0,1).

Die Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

8 Diskussion

Das Komplementsystem als bedeutender Teil unserer angeborenen Immunität wird über den Alternativen Weg kontinuierlich aktiviert und unterliegt einer strengen Kontrolle und Regulation. Ein Ungleichgewicht im Zusammenspiel der Regulator- und Aktivierungsproteine führt zur unkontrollierten Aktivität des Systems, und resultiert so im Angriff und letztendlich auch in der Zerstörung körpereigener Strukturen. Unter anderem ist die Expression von CFHR5-Hybridproteinen die Ursache für die Entgleisung der Komplementhomöostase und für die Entstehung der schwerwiegenden Nierenerkrankung C3- Glomerulopathie. Die funktionelle Charakterisierung des “normalen“ CFHR5 Proteins sollte dessen Funktion im Komplementsystem klären. Um im zweiten Schritt daraus abzuleiten, wie krankheitsassoziierte CFHR5- Hybridproteine zur Pathogenese der C3- Glomerulopathie beitragen.

Im Rahmen dieser Dissertation habe ich untersucht, (I) ob CFHR5 an zelluläre Oberflächen, i.e. an intakte und modifizierte Zellen bindet, (II) ob CFHR5 mit den Liganden Heparin, Properdin, sowie C3- Aktivierungsfragmenten interagiert und (III) um die Bindestellen innerhalb von CFHR5 zu analysieren, habe ich vier CFHR5 Deletionsmutanten eingesetzt. Mithilfe der vier CFHR5 Deletionsmutanten wurde die CFHR5- Binderegion für zelluläre Oberflächen und die einzelnen Liganden lokalisiert.

CFHR5 bindet an Zelloberflächen

Rekombinantes CFHR5 bindet an zelluläre Oberflächen. CFHR5 bindet sowohl an humane Endothelzellen (HUVEC) als auch an nicht humane Zellen (CHO Zellen). CFHR5 bindet sowohl an intakte als auch an modifizierte Oberflächen von humanen Endothelzellen. Dabei bindet CFHR5 mit höchster Intensität an spätapoptotische und nekrotische Zellen. Mit geringer Intensität bindet CFHR5 an intakte zelluläre Oberflächen und an frühapoptotische Zellen (Tabelle 4, Zeile 1).

Aufgrund der Homologie der C- Termini von CFHR5 und CFHR1 bzw. Faktor H (41- 67 %) wurde vermutet, dass CFHR5, ebenso wie CFHR1 und Faktor H über die C- terminalen Domänen, i.e. SCR8 und SCR9 an Oberflächen bindet. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die Oberflächenbinderegion von CFHR5 im Bereich der Domänen SCR3 bis SCR7 lokalisiert ist, und nicht wie postuliert, in der C- terminalen Domäne. Der Vergleich der möglichen Bindedomänen von CFHR5 mithilfe der CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2}, CFHR5₃₋₇ und CFHR5_{8,9} zeigt, dass einzig der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₇, i.e. die

Domäne SCR3 bis SCR7 sowohl an humane (intakte und modifiziert) als auch nicht humane Zellen bindet (Tabelle 4, Zeilen 2,3 und 5). Mit höchster Intensität bindet der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₇ an modifizierte, i.e. spätapoptotische und nekrotische humane Zellen (HUVEC). Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5_{8,9}, der den C- Terminus von CFHR5 repräsentiert, bindet schwach an spätapoptotische und nekrotische humanen Zellen (Tabelle 4, Zeile 5). Der N- Terminus von CFHR5 trägt nicht zur Oberflächenbindung bei (Tabelle 4, Zeile 2).

Die Oberflächenbindedomäne von CFHR5 ist im Bereich der Domänen SCR3 bis SCR7 lokalisiert und die C-terminalen Domänen, i.e. SCR8 und SCR9 unterstützen die Oberflächenbindung an spätapoptotische und nekrotische Zellen (Tabelle 4, Abb. 25). Die Bindung des aus Mittelregion und C- Terminus kombinierten CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ wird im Folgenden analysiert werden.

	HUVEC				
	CHO Zellen	Intakte	Frühapoptotische	Spätapoptotische	Nekrotische
CFHR5	++	++	++	++++ ++++	++++ ++++
CFHR5_{1,2}	-	-	-	-	-
CFHR5₃₋₇	+	+	+	++	++
CFHR5₃₋₉	+	+	+(+)	++++	++++
CFHR5_{8,9}	-	-	-	+	+

Tabelle 4: CFHR5 bindet an zelluläre Oberflächen: Lokalisation der CFHR5 Oberflächenbindedomäne.

CFHR5 bindet an CHO Zellen und HUVEC. CFHR5 bindet mit höchster Intensität an die Zelloberflächen von spätapoptotische und nekrotische HUVEC. Die Region SCR3 bis SCR7 von CFHR5 enthält die Zellbindedomäne von CFHR5 und wird bei der Bindung an spätapoptotische und nekrotische Zellen durch die Domänen SCR8 und SCR9 unterstützt.

Die Zeichen in der Tabelle wurden zur Vereinfachung gewählt (+ Bindung; - keine Bindung).

CFHR5 besitzt eine weitere Dimerisierungsdomäne im C- terminalen Bereich, in SCR8 und SCR9

In dieser Arbeit wurde eine weitere, zweite Dimerisierungsdomäne im CFHR5 Protein identifiziert, die im C- Terminus, i.e. in SCR8 und SCR9 lokalisiert ist (Abb. 25). Diese zweite Dimerisierungsdomäne ist zusätzlich zu der bereits in SCR1 und SCR2 lokalisierten Dimerisierungsdomäne (Goicoechea de Jorge et al. 2013) vorhanden. Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} bildeten Dimere. Nach Auftrennung der Fragmente, i.e. per SDS- Gelelektrophoresen und anschließendem Western Blot hatte der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₉ eine Mobilität von 48 und auch von 96 kDa und der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5_{8,9} hatte eine Mobilität von 14 und 28 kDa (7.4). Die detektierten Proteinbanden repräsentieren die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} in monomerer Form (48 bzw. 14 kDa) und die Banden bei doppelter Molekülmasse (96 bzw. 28 kDa) entsprechen der dimeren Variante von CFHR5₃₋₉ bzw. CFHR5_{8,9}. Für die Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} wurden bei diesen Untersuchungen neben der monomeren Variante stets Dimere detektiert.

Mit dem verwendeten Versuchsansatz für die Proteinauftrennung konnten keine Dimerbanden des CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} nachgewiesen werden. Die Aminosäure- Sequenz des N- bzw. C- Terminus von CFHR5 ist verschieden (Goicoechea de Jorge et al. 2013). Somit können verschiedene Bedingungen, wie die Hydrophilie der Proteine sowie die Ionenstärke und der pH- Wert des eingesetzten Puffers u.a. für die Interaktion des N- und C- Terminus von Bedeutung sein und die gewählten experimentellen Bedingungen zur Instabilität der N- Terminus- Interaktion führen.

An dieser Stelle beziehen wir den CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ in die Betrachtung der Oberflächenbindung von CFHR5 hinsichtlich zuständiger Bindedomänen ein (Tabelle 4, Zeile 4). Der CFHR5 Deletionsmutant CFHR5₃₋₉ bindet mit höherer Intensität v.a. an apoptotische und nekrotische Oberflächen als der Deletionsmutant CFHR5₃₋₇. Die stärkere Oberflächenbindung des Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ kann durch zwei Aspekte erklärt werden. Zum einen besitzt CFHR5₃₋₉ die Oberflächenbindungsdomäne von CFHR5, i.e. SCR3 bis SCR7 und zusätzlich verfügt der Deletionsmutant über die zweite, neu entdeckte C- terminale Dimerisierungsregion, i.e. SCR8 und SCR9. Somit bindet CFHR5₃₋₉ auch als Dimer an die zellulären Oberflächen. Diese Dimere exponieren dem detektierenden Antikörper mehr Bindestellen und generieren somit ein höheres Signal für gebundenes CFHR5₃₋₉ als für CFHR5₃₋₇, welches als Monomer bindet.

Ligandenbindung von CFHR5

In der vorliegenden Dissertation wurden potentielle CFHR5- Liganden, i.e. Heparin, C3- Aktivierungsfragmente und Properdin untersucht. CFHR5 bindet an Heparin, an Properdin, den einzig bisher bekannten Komplementaktivator, sowie an die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d (Tabelle 5). CFHR5 bindet mit den Domänen SCR3 bis SCR7 an Heparin. Diese Ergebnisse bekräftigen, dass die SCR3 bis SCR7 eine wichtige Region für die Heparinbindung von CFHR5 darstellen. Sie zeigen, dass CFHR5 nur eine Bindestelle für Heparin hat. Die Mittelregion, i.e. SCR3 bis SCR7 von CFHR5 bindet ebenfalls Properdin sowie an die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d. CFHR5 bindet dabei mit höchster Intensität an C3d (Abb. 25).

	Heparin	Properdin	C3b	iC3b	C3c	C3d
	C3 Aktivierungsfragmente					
CFHR5	++	+++	+++	+++	++(+)	++++
CFHR5_{1,2}	-	-	-	-	-	-
CFHR5₃₋₇	+	++	+	+	+	+++
CFHR5₃₋₉	+	++(+)	++	++	++	++(+)
CFHR5_{8,9}	-	-	-	-	-	-

Tabelle 5: Lokalisation der Ligandeninteraktionsdomäne von CFHR5.

CFHR5 bindet an Heparin, Properdin, sowie an die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d. Die Liganden- Interaktionsdomäne von CFHR5 ist in SCR3 bis SCR7 lokalisiert. Die Zeichen in der Tabelle wurden zur Vereinfachung gewählt (+ Bindung; - keine Bindung).

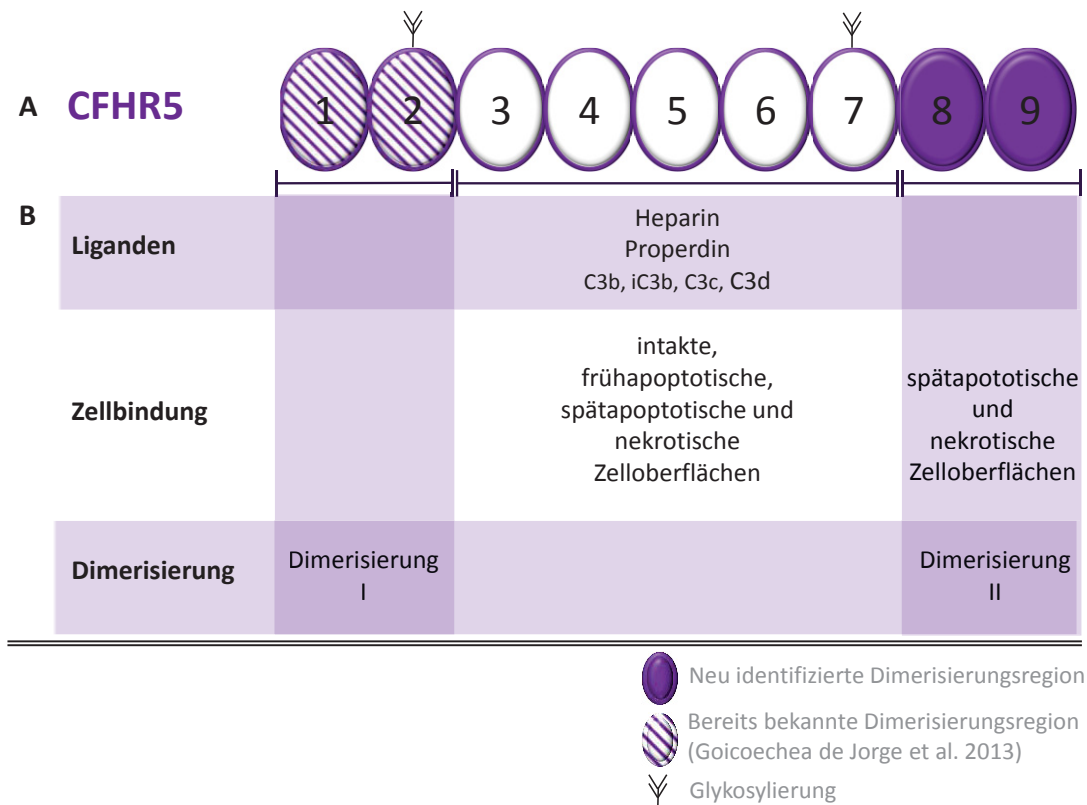


Abb. 25: Domänenstruktur von CFHR5 und Funktion der Domänen.

(A) Domänenstruktur von CFHR5. Gekennzeichnet sind die Glykosylierungen an SCR2 und SCR7. (B) Gezeigt sind die Funktionen der einzelnen CFHR5 Domänen. Die Domäne SCR3 bis SCR7 repräsentiert die Interaktionsdomäne von CFHR5 für die Liganden Heparin, Properdin sowie die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d. Die Domäne SCR3 bis SCR7 repräsentiert auch die Oberflächenbindungsregion von CFHR5. SCR8 und SCR9 von CFHR5 tragen zur Bindung an spätapoptotische und nekrotische Zellen bei. CFHR5 besitzt neben der bereits lokalisierten Dimerisierungsdomäne in SCR1 und SCR2 (Goicoechea de Jorge et al. 2013) eine zweite, in der vorliegenden Arbeit identifizierte Dimerisierungsdomäne in SCR8 und SCR9.

CFHR5 reguliert die Komplementhomöostase auf modifizierten körpereigenen Zellen

Aus den gewonnen Erkenntnissen bezüglich der Ligandeninteraktion, Oberflächenbindung und Dimerisierung von CFHR5, wurde ein Modell zur physiologischen Bedeutung von CFHR5 entwickelt. CFHR5 bindet mit hoher Intensität an modifizierte zelluläre Oberfläche, i.e. apoptotische und nekrotische Zellen. Während der Apoptose verändert sich die Membranstruktur der Zellen, die Expression membrangebundener Komplementregulatoren, wie MCP (CD46), DAF (CD55) und Protektin (CD59) wird reduziert und zytoplasmatisch orientiertes Phosphatidylserin wird auf die äußere Seite der Zellmembran verlagert (Martin et al. 1995, Fishelson et al. 2001, Cole et al. 2006). Nekrotische Zellen besitzen ebenfalls eine stark veränderte Oberflächenstruktur (Kroemer et al. 2009, Li et al. 2014). CFHR5 bindet an die modifizierte Oberfläche und die zwei endständigen Dimerisierungsdomänen ermöglichen die Bildung von hochmolekularen CFHR5 Komplexen, die zu einer netzartigen Bedeckung der modifizierten Zelloberfläche mit CFHR5 Multimeren führt (Abb. 26A).

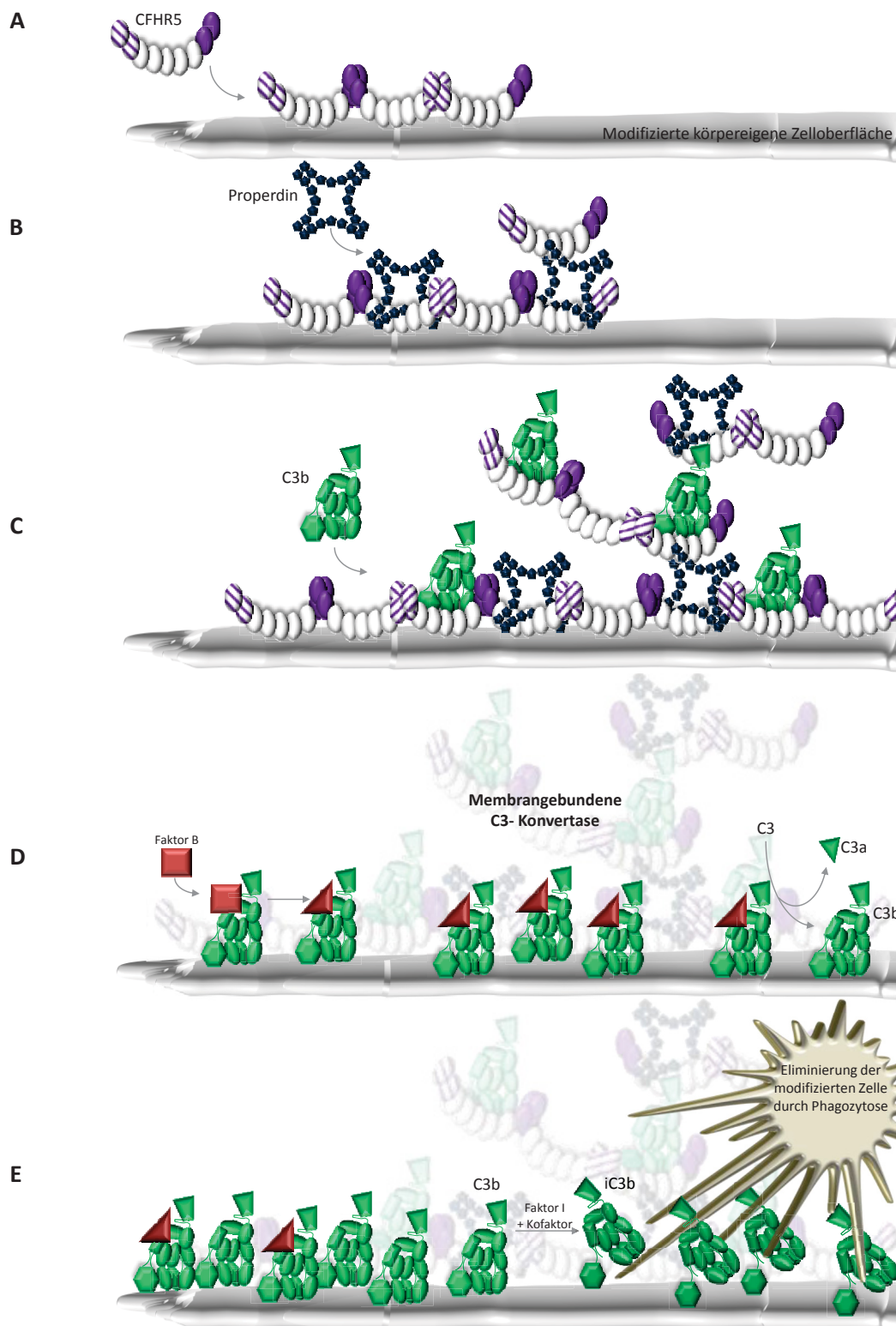


Abb. 26: CFHR5 aktiviert Komplement auf modifizierten körpereigenen Oberflächen.

(A) CFHR5 bindet an modifizierte körpereigene Oberflächen und multimerisiert via N- und C-terminaler Dimerisierungsdomänen. (B) CFHR5 rekrutiert Properdin. (C) CFHR5 rekrutiert C3b. CFHR5- und Properdin- Multimere sowie C3- Aktivierungsfragmente bilden ein molekulares Netzwerk auf der modifizierten Zelloberfläche. (D) Die CFHR5:Properdin Komplexe verstärken lokal die Bildung der membrangebundenen C3- Konvertase und erhöhen so die Komplementaktivität. (E) Die formierten C3- Konvertasen bilden große Mengen des Opsonins C3b, welches auf der modifizierten Zelle deponiert wird. Faktor I und Kofaktoren (Faktor H, CR1, MCP) prozessieren C3b zu iC3b. Phagozyten erkennen die opsonisierte Oberfläche und eliminieren die Zielzelle ohne eine Entzündungsreaktion zu induzieren.

Das an die Oberfläche gebundene CFHR5 wirkt als Anker und rekrutiert Properdin (Abb. 26B). CFHR5 rekrutiert auch C3b, welches durch die Aktivität der C3- Konvertase des Alternativen Weges des Komplementsystems kontinuierlich gebildet wird (Abb. 26C).

Welche Funktion hat das molekulare Netzwerk aus CFHR5- und Properdin- Multimeren sowie C3- Aktivierungsfragmenten auf der Oberfläche der modifizierten Zelle? Das Netzwerk aus CFHR5, Properdin und C3b verstärkt die Bildung der C3- Konvertase. CFHR5 selbst ist ein Komplementaktivator und verstärkt den Aufbau der C3- Konvertase auf modifizierten körpereigenen Zellen (Chen et al. 2015). Überdies bildet CFHR5 durch seine N- und C-terminalen Dimerisierungsdomänen multimere Komplexe aus und intensiviert so die Bindung an die Oberfläche (Abb. 26A). Desweiteren besitzt CFHR1 in dimerer Form im Vergleich zum Monomer verstärkte Effektorfunktion. Dimeres CFHR1 verdrängt Faktor H stärker von C3b als monomeres CFHR1 (Goicoechea de Jorge et al. 2013). Die Dimerisierung könnte auch für CFHR5 gesteigerte Effektorfunktionen bedeuten, i.e. die Dimerisierung von CFHR5 verstärkt über mehr Bindestellen zusätzlich den Aufbau der C3- Konvertase. Desweiteren bildet jedes der beiden Proteine, CFHR5 und Properdin hochmolekulare Komplexe aus. CFHR5 bindet Properdin und beide Proteine zusammen bilden noch größere Komplexe, welche funktionell relevant sind. Diese CFHR5:Properdin Komplexe verstärken den Aufbau und die Funktion der C3- Konvertase etwa 4- fach im Vergleich zu CFHR5 ohne Properdin (Chen et al. 2015). Die auf der Oberfläche der modifizierten Zelle gebildeten CFHR5:Properdin Komplexe können die Bildung der membrangebundenen C3- Konvertase aus den im Netzwerk gebundenen C3b Molekülen potenzieren und so zu einer lokal verstärkten Komplementaktivität führen (Abb. 26D).

Die neu formierten membrangebundenen C3- Konvertasen beladen die modifizierte körpereigene Oberfläche mit dem C3- Aktivierungsfragment C3b. Faktor I spaltet C3b zu iC3b (Nilsson et al. 2011). Als Kofaktoren für Faktor I wirken Faktor H, welcher über Sialinsäuren oder Glykosaminoglykane wie Heparin (Fearon 1978, Rodriguez de Cordoba et al. 2004) und C3b an die opsonisierte körpereigene Zelle bindet, ebenso wie CR1 (CD35) auf Makrophagen (Java et al. 2015). Das gebildete iC3b ist Ligand der Komplementrezeptoren CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) auf Makrophagen und vermittelt die Phagozytose der Zielzelle (Ross und Vetvicka 1993, Mevorach et al. 1998). Amarilyo et al. (2010) zeigte, dass die Interaktion von iC3b mit CR3 und CR4 die Sekretion von anti- inflammatorischem Interleukin-10 durch die Makrophagen steigert und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin- 6 und *Transforming Growth Factor* (TGF)- β , verhindert. CFHR5 gewährleistet über die lokale Komplementaktivierung und die

Opsonisierung der veränderten körpereigenen Oberfläche und die Eliminierung der Zielzelle durch Phagozytose ohne Entzündung zu induzieren (Abb. 26E).

CFHR5 und C3d und ihr Zusammenspiel mit dem adaptiven Immunsystem bei der Beseitigung von infektiösen Erregern

CFHR5 interagiert neben C3b und iC3b auch mit anderen C3- Aktivierungsfragmenten. Im ELISA- Experiment wurde die Bindung von CFHR5 an die C3- Aktivierungsfragmente C3b, iC3b, C3c und C3d untersucht (7.9.1). CFHR5 bindet bevorzugt an prozessierte C3- Moleküle; CFHR5 bindet mit höchster Intensität an C3d, mit moderater Intensität an C3b sowie an iC3b und mit geringerer Intensität an C3c (Abb. 27).

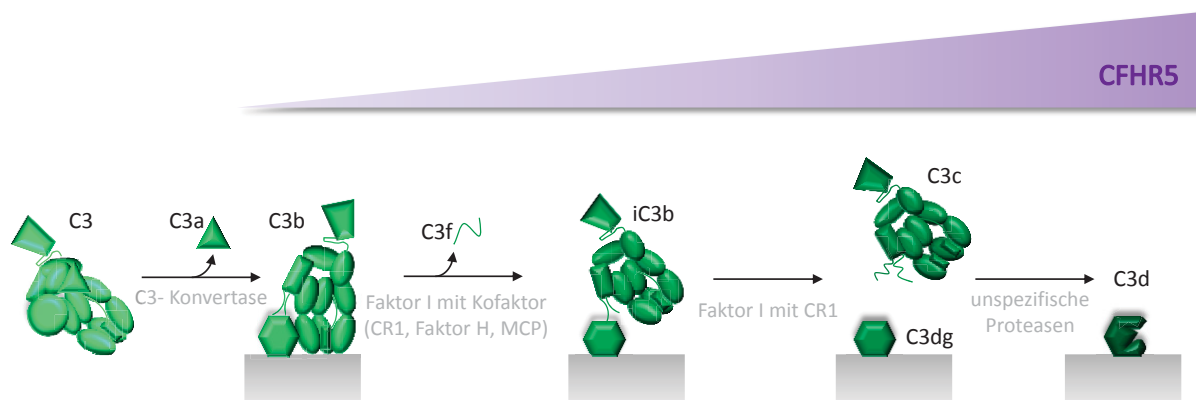


Abb. 27: CFHR5 bindet die C3- Aktivierungsfragmente mit unterschiedlicher Intensität.

CFHR5 interagiert bevorzugt mit prozessierten C3- Aktivierungsfragmenten, i.e. mit C3d. C3 wird durch die C3- Konvertase in C3a und C3b gespalten. C3b wird unter Abspaltung von C3f zu iC3b durch Faktor I sowie einen Kofaktor (CR1, Faktor H, MCP). Faktor I und CR1 (CD35) spalten iC3b in C3c und C3dg, welches durch unspezifische Proteasen zu C3d prozessiert wird (Morgan et al. 2011). Die Struktur der C3- Aktivierungsfragmente wurde nach Janssen et al. (2006) verändert.

Warum bindet CFHR5 als Komplementaktivator mit höchster Intensität an prozessierte C3- Moleküle wie C3d? Eine mögliche Erklärung ist, dass CFHR5, das an C3d gebunden ist, die Interaktion von C3d mit seinem Rezeptor CR2 (CD21) beeinflusst. Der CR2 Rezeptor ist zusammen mit CD19 und CD81 Teil des B- Zell- Co- Rezeptor- Komplexes (Qin et al. 1998). Der B- Zell- Co- Rezeptor- Komplex erleichtert die Aktivierung der B- Zelle und verstärkt die Signalgebung des B- Zell- Rezeptors (Merle et al. 2015b). An CR2 gebundenes C3d wirkt als Adjuvans und erniedrigt die Schwelle für die B- Zell- Aktivierung 1.000- 10.000 fach (Dempsey et al. 1996). Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn geringe Mengen eines Antigens vorhanden sind, wie beim Eintritt infektiöser Erreger in den Organismus (Carroll und Isenman 2012). CFHR5 könnte über die Bindung von C3d die Interaktion von C3d mit CR2 auf den B- Zellen modulieren und so die Aktivierung der B- Zelle und die Aktivität des

adaptiven Immunsystems potenzieren. In den Körper eingedrungene infektiöse Erreger können so schneller beseitigt werden.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die CFHR5- C3d Interaktion die follikulär dendritischen Zellen beeinflusst. Auch follikuläre dendritische Zellen exprimieren CR2 und sie konzentrieren Immunkomplexe aus Antigen, Antikörper und Komplement, i.e. C3d auf ihrer Oberfläche (Suzuki et al. 2009). Die follikulär dendritischen Zellen stehen in Kontakt mit den B- Zellen und spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung und den Erhalt von Gedächtnis- B- Zellen (Roozendaal und Carroll 2007, Gonzalez et al. 2011). CFHR5 könnte über die Bindung an C3d die Interaktion von C3d mit CR2 auf den follikulär dendritischen Zellen modulieren und auch die Interaktion von CR2 gebundenem C3d mit den B- Zellen unterstützen. CFHR5 hätte somit wiederum Einfluss auf die B- Zell- Entwicklung.

C3d ist die „Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunität“ (Fearon und Carter 1995, Dempsey et al. 1996, Rickert 2005, Tedder 2010). In der beschriebenen Theorie kann CFHR5 über seine Bindung an C3d diese Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort stützen, indem CFHR5 die B- Zell- Aktivierung und die B- Zell- Gedächtnis- Entwicklung erleichtert. Somit beschleunigt CFHR5 die Antwort des adaptiven Immunsystems und trägt somit zur schnellen Beseitigung von infektiösen Erregern bei. Dies ist eine mögliche Variante, welche Wirkung CFHR5 über seine Interaktion mit C3d ausübt. Auch ein inhibitorischer Effekt der CFHR5- C3d Interaktion wäre möglich. Die Bindung von CFHR5 an C3d könnte auch die Bindung von C3d an CR2 verhindert. CFHR5 könnte so die Interaktion von C3d mit seinem Rezeptor CR2 auf B- Zellen und follikulär dendritischen Zellen ebenso blockieren.

CFHR5 übt über seine Interaktion den C3- Aktivierungsfragmenten und dem Komplementaktivator Properdin vielfältige Funktionen aus. In Abb. 28 sind die in der vorliegenden Dissertation entwickelten Modelle zu den Interaktionen von CFHR5 mit den möglichen Funktionen gezeigt.

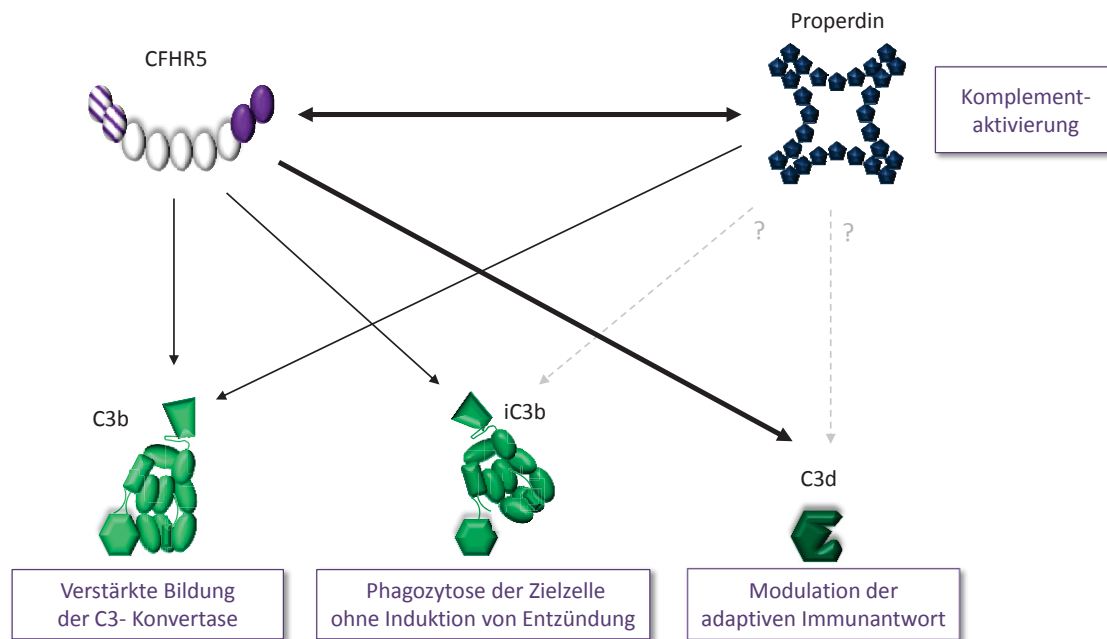


Abb. 28: CFHR5, Properdin und C3- Aktivierungsfragmente interagieren miteinander.

CFHR5 interagiert stark mit dem Komplementaktivator Properdin und C3d. CFHR5 interagiert ebenfalls mit C3b und iC3b. Properdin bindet an C3b (Fearon und Austen 1975). Dargestellt sind desweiteren die aus den Interaktionen resultierenden Funktionen, welche als Modell in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden.

CFHR5- Hybridproteine stören die Komplementhomöostase

Bisher wurde aus den Daten die Rolle des “normalen” CFHR5 Proteins für die Immunantwort dargestellt. Es schließt sich die Frage an, weshalb die CFHR5- Hybridproteine die Nieren betroffener Patienten schädigen und zur Ausprägung der C3- Glomerulopathie führen. Beide CFHR5- Hybridproteine, i.e. das ‘Jena’ CFHR2_{1,2}- CFHR5- Hybridprotein und das ‘Cypriotische’ CFHR5_{1,2}- CFHR5- Hybridprotein sind wie CFHR5 Komplementaktivatoren (Gale et al. 2010, Chen et al. 2014, Chen et al. 2015). Jedoch unterscheiden sich die krankheitsassoziierten CFHR5- Hybridproteine vom “normalen” CFHR5 Protein. CFHR5 aktiviert das Komplementsystem im Gegensatz zu den Hybridproteinen ausschließlich auf Oberflächen (Chen et al. 2014, Chen et al. 2015). CFHR5 führt zur geordneten Komplementaktivierung, gegen welche intakte Zellen ausreichend durch Komplementregulatoren geschützt sind. Auf veränderten körpereigenen Zellen führt CFHR5 zur weiteren Komplementaktivierung mit der Rekrutierung von Properdin (Abb. 29, Spalte I). Das ‘Jena’ CFHR2_{1,2}- CFHR5- Hybridprotein dagegen steigert den Aufbau und die Aktivität der C3- Konvertase sowohl auf Oberflächen und als auch in der Flüssigphase um ein Vielfaches. CFHR2_{1,2}- CFHR5 verstärkt die systemische und auch die lokale Komplementaktivierung und führt zum C3- Verbrauch in der Flüssigphase. CFHR2_{1,2}- CFHR5 besitzt eine doppelte N- terminale Dimerisierungsdomäne und bildet hochmolekulare

Komplexe von über 10 einzelnen Komponenten (Chen et al. 2015). Diese Multimerkomplexe steigern die Effektorfunktion des Hybridproteins, indem sie die Stabilität der C3- Konvertase erhöhen. CFHR2_{1,2}- CFHR5- Multimere binden stärker an die C3- Konvertase und steigern die Aktivität der C3- Konvertase 2- 3 fach im Vergleich zu CFHR5. Die CFHR2_{1,2}- CFHR5- Multimere verlängern die Halbwertszeit der C3- Konvertase und blockieren zusätzlich den Abbau der Konvertase durch Faktor H (Chen et al. 2014).

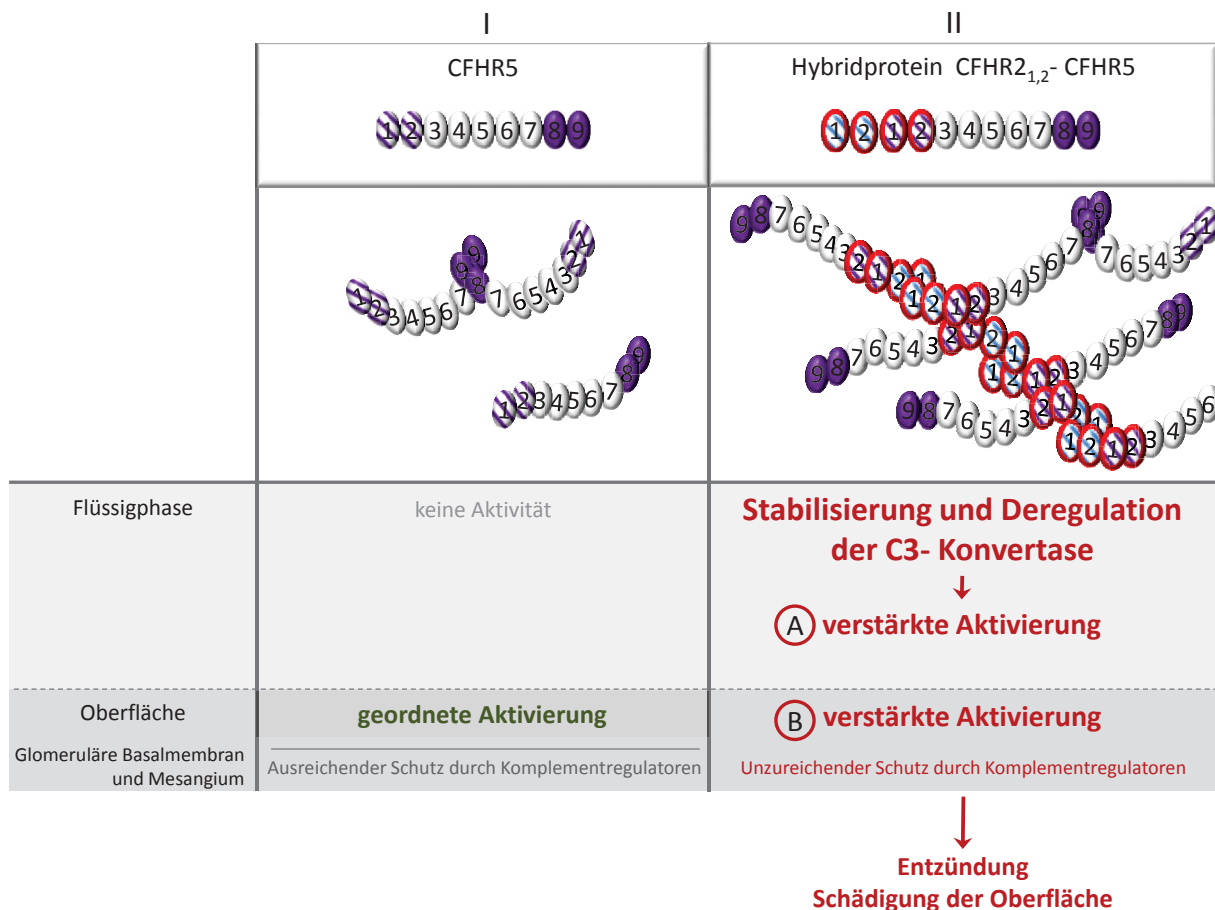


Abb. 29: Komplementaktivität von CFHR5 und dem Hybridprotein CFHR2_{1,2}- CFHR5

(I) CFHR5 besitzt keine Flüssigphaseaktivität und aktiviert das Komplementsystem ausschließlich auf Oberflächen (Chen et al. 2014, Chen et al. 2015). CFHR5 kann das Komplementsystem geordnet auf intakten Oberflächen aktivieren und schädigt die Zellen nicht, da diese ausreichend durch Komplementregulatoren geschützt sind. (II) Das Hybridprotein CFHR2_{1,2}- CFHR5 dahingegen besitzt eine doppelte N- terminale Dimerisierungsdomäne (gekennzeichnet durch rote Umrandung) und gesteigerte Effektorfunktionen. CFHR2_{1,2}- CFHR5 dereguliert und aktiviert das Komplementsystem auch im Plasma betroffener Patienten (Chen et al. 2014, Chen et al. 2015). Es kommt zur verstärkten Bildung der C3- Konvertase in der Flüssigphase und zur Generierung von C3- Aktivierungsfragmenten. Die Glomeruläre Basalmembran besitzt keine und das Mesangium vermutlich wenig membrangebundene Komplementregulatoren (Nangaku 1998, Thurman und Renner 2011, McCullough et al. 2013). Somit sind die Glomeruläre Basalmembran und das Mesangium vermutlich unzureichend geschützt. CFHR2_{1,2}- CFHR5 bindet an diese Strukturen und führt zur verstärkten Komplementaktivierung auf der Oberfläche. Das Hybridprotein CFHR2_{1,2}- CFHR5 kann so eine lokale Entzündungsreaktion induzieren und die Glomeruläre Basalmembran und das Mesangium der Niere schädigen.

Warum gerade die Niere, i.e. die Glomeruläre Basalmembran und die mesangialen Zellen von der systemischen Komplementaktivierung durch die CFHR5- Hybridproteine betroffen ist, kann durch zwei Aspekte erklärt werden. Zum einen kann das Hybridprotein CFHR2_{1,2}-CFHR5 durch seine doppelte N- terminale Dimerisierungsdomäne die C3- Konvertase in der Flüssigphase binden, aktivieren und stabilisieren. CFHR2_{1,2}- CFHR5 führt zu Generierung von C3- Aktivierungsfragmenten, i.e. dem Anaphylatoxin C3a und dem Opsonin C3b. C3b bewirkt die vermehrte Bildung von C3- Konvertasen und die Formierung der C5- Konvertase mit Generierung von weiterem Anaphylatoxin, i.e. C5a. Das Hybridprotein CFHR2_{1,2}-CFHR5 bewirkt somit die starke Komplementaktivierung mit der Generierung von Aktivierungsfragmenten in der Flüssigphase (Abb. 29, Spalte IIA). Dass vor allem die Glomeruläre Basalmembran sowie das Mesangium der Niere bei der C3- Glomerulopathie geschädigt wird (Sethi et al. 2012, Cook und Pickering 2015), lässt postulieren, dass sowohl die Glomeruläre Basalmembran als auch das Mesangium unzureichend geschützt ist. Die Glomeruläre Basalmembran besitzt keine und das Mesangium vermutlich wenig membrangebundene Komplementregulatoren (Nangaku 1998, Thurman und Renner 2011, McCullough et al. 2013). Somit besteht ein Ungleichgewicht zwischen deregulierter, starker Komplementaktivierung durch die CFHR5- Hybridproteine und Schutz der Glomerulären Basalmembran und des Mesangiums. CFHR2_{1,2}- CFHR5 bindet an diese Strukturen und kann das Komplementsystem auch auf den intakten Oberflächen der Glomerulären Basalmembran und der mesangialen Zellen aktivieren. Hier generiert und stabilisiert CFHR2_{1,2}- CFHR5 die C3- und C5- Konvertase mit der Induktion von Entzündung und der Schädigung dieser Zellen. Darüber hinaus induziert CFHR2_{1,2}- CFHR5 auch die Bildung des Terminalen Komplexes (Chen et al. 2015) und führt somit zur Intensivierung der Komplementaktivierung und zu hohen Zellschäden (Abb. 29, Spalte IIB). Die starke Komplementaktivierung auf der Glomerulären Basalmembran und dem Mesangium der Nieren betroffener Patienten schränkt die glomeruläre Funktion zunehmend ein und führt bis zum terminalen Nierenversagen (Alchi und Jayne 2010, Mathur et al. 2015).

Dies ist eine Möglichkeit der Erklärung. Der genaue Grund, warum vor allem die Niere und hier insbesondere die Glomeruläre Basalmembran und das Mesangium durch die systemische Überaktivität des Komplementsystems geschädigt wird, ist unklar und ein weiterer wichtiger Forschungsansatz, der beim Verständnis der komplexen Nierenerkrankung C3- Glomerulopathie helfen wird.

9 Ausblick

Weitere Ansätze für die Erforschung der Rolle von CFHR5

CFHR5 ist ein Komplementaktivator (Chen et al. 2014, Chen et al. 2015) und bindet an modifizierte körpereigene Zellen. Durch die Aktivierung des Alternativen Weges des Komplementsystems auf modifizierten körpereigenen Oberflächen könnte CFHR5 die schnelle und nicht- inflammatorische Beseitigung von veränderten körpereigenen Partikeln und Zellen garantieren. Auf der anderen Seite interagiert CFHR5 mit C3d und könnte eine wichtige Rolle bei der Modulation der adaptiven Immunantwort haben. Die in dieser Arbeit dargestellten neuen Funktionen von CFHR5 sind von Bedeutung für die Darstellung der genauen biologischen Funktion des CFHR5 Proteins und bieten neue Ansätze für das Verständnis der C3- Glomerulopathie. Anknüpfende Experimente sollten die neu entwickelten Konzepte und Modelle stützen.

CFHR5 zeigt sich als Komplementaktivator und chromosomale Änderungen im CFHR- Gencluster mit der Expression von CFHR5- Hybridproteinen sind mit der schwerwiegenden Nierenerkrankung C3- Glomerulopathie assoziiert. Um eine Therapie der C3- Glomerulopathie entwickeln zu können, muss man den Krankheitsmechanismus verstehen und den Angriffsort der CFHR5- Hybridproteine untersuchen. Hierzu ist die Kenntnis der genauen Funktion von CFHR5 essentiell. Die folgenden vier Beispiele zeigen relevante Ansätze zur weiteren Erforschung der Funktion von CFHR5. (a) Zunächst ist es von Bedeutung die Oberflächenliganden von CFHR5 zu identifizieren, da diese möglicherweise auch die Zielstrukturen der CFHR5- Hybridproteine sind und potentielle therapeutische Ziele bei der Behandlung der C3- Glomerulopathie darstellen, (b) desweiteren sollte die neu beschriebene, zweite Dimerisierungsdomäne durch ergänzende Experimente bestätigt werden, (c) um die funktionellen Einheiten der CFHR5 Domänen genauer zu lokalisieren, sollte die Mitteldomäne von CFHR5 weiter zerlegt und analysiert werden und (d) die genaue funktionelle Charakterisierung von CFHR5 als Komplementregulator ist von besonderer Bedeutung für das Verständnis, wie CFHR5 die Komplementhomöostase reguliert und kann Einblicke in den Pathomechanismus der C3- Glomerulopathie geben.

zu a) Identifizierung der CFHR5- Liganden auf intakten, apoptotischen und nekrotischen Zellen

CFHR5 bindet an Heparin und so kann CFHR5 mit Heparin als Ligand an Oberflächen binden. Weitere natürliche CFHR5 Liganden, welche die Bindung von CFHR5 entweder an intakte, und vor allem an modifizierte Oberflächenflächen, wie apoptotische und nekrotische Zellen vermitteln, sollten identifiziert und die Interaktion im Detail untersucht werden.

Apoptotische Zellen verändern ihre Oberfläche zum einen dadurch, dass die membrangebundenen Komplementregulatoren auf der Zelloberfläche reduziert sind und zum anderen durch die Verlagerung von zytoplasmatisch orientiertem Phosphatidylserin und -cholin auf die äußere Seite der Zellmembran (Martin et al. 1995, Fishelson et al. 2001, Cole et al. 2006). Im ersten Schritt sollte deshalb untersucht werden, ob Phosphatidylserin bzw. -cholin auf apoptotischen Zellen als CFHR5 Liganden agieren. Bei der Nekrose geht die Zellintegrität verloren und hier werden weitere Komponenten, wie freie DNA, exponiert (Kroemer et al. 2009, Li et al. 2014). Freie DNA ist daher ebenfalls ein potentieller Oberflächenligand für CFHR5. Der Liganden- Nachweis kann wie in dieser Arbeit beispielhaft gezeigt mittels Fluoreszenzmikroskopie, ELISA oder auch Oberflächenplasmonenresonanz durchgeführt werden.

zu b) Bestätigung der zweiten Dimerisierungsdomäne im C- Terminus, i.e. SCR8- SCR9 von CFHR5

Der Dimer- Nachweis des N- Terminus von CFHR5 und CFHR1 sowie CFHR2 gelang unter nativen Bedingungen mittels Größenausschlusschromatographie (Goicoechea de Jorge et al. 2013, Chen et al. 2015). Um die Rolle der C- terminalen Dimerisierungsdomäne von CFHR5, i.e. SCR8 bis SCR9 sicher zu bestätigen, sollten die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5₃₋₉ und CFHR5_{8,9} ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie untersucht werden. Über die Größe der gebildeten Komplexe kann dann die Dimerisierung der C-Termini von CFHR5 unter nativen Bedingungen nachgewiesen werden und somit die zweite CFHR5 Dimerisierungsdomäne mit einer weiteren unabhängigen Methode herausgearbeitet werden. Desweiteren sollte geprüft werden, ob die N- und C- terminalen Dimerisierungsdomänen auch miteinander interagieren oder ob die Interaktion exklusive an der N- bzw. der C- terminalen Region vorliegt. Hierfür können die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5_{1,2} und CFHR5₃₋₉ miteinander inkubiert und die gebildeten Komplexe ebenfalls mittels Größenausschlusschromatographie untersucht werden. Aus der Größe der eluierten Komplexe kann dann abgeleitet werden, ob N- und C- Terminus von CFHR5 miteinander interagiert.

zu c) Eingrenzung der Interaktionsdomänen von CFHR5

Die Domänen für die Oberflächenbindung und Liganden- Interaktion von CFHR5 sollten zur genaueren Bestimmung der funktionellen Domänen weiter eingegrenzt werden. Hierzu sollten kleinere CFHR5 Deletionsmutanten der Mittelregion generiert und rekombinant exprimiert werden. Diese Fragmente der Mitteldomäne sollten ebenfalls hinsichtlich ihrer Bindung an zelluläre Oberflächen und Liganden untersucht werden.

zu d) Funktion von CFHR5

Der spannendste Ansatz ist die funktionelle Untersuchung von CFHR5 als Aktivator des Komplementsystems. In der vorliegenden Dissertation wurde die Interaktion von CFHR5 mit Liganden Heparin, Properdin und den C3- Aktivierungsfragmenten C3b, iC3b, C3c und C3d nachgewiesen. Wie CFHR5 die Komplementaktivität auf zellulären Oberflächen reguliert, ist eine wichtige Frage zur genauen Darstellung der Funktion des Proteins. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass CFHR5 die modifizierten Oberflächen von apoptotischen und nekrotischen körpereigenen Zellen bindet und auf diesen Oberflächen die Bildung der C3- Konvertase des Alternativen Weges verstärkt. In weiterführenden Experimenten sollte deshalb überprüft werden, ob CFHR5 die Komplementaktivität auf die C3- Konvertase beschränkt oder ob CFHR5 auch die C5- Konvertase, sowie den Terminalen Komplex beeinflusst. Hierzu sollte CFHR5 auf die Oberfläche von apoptotischen und nekrotischen Zellen gebunden werden und im ersten Schritt durch Inkubation mit C3, Faktor D und Faktor B und durch Messung von C3a- oder der C3b- Deposition die Aktivität der C3- Konvertase bestimmt werden. Analog dazu wird dann im nächsten Schritt nach Zugabe von C5 die Aktivität der C5- Konvertase durch Messung von C5a bzw. C5b bestimmt. Desweiteren kann nach Inkubation des zellgebundenen CFHR5 mit den zusätzlichen Komplementkomponenten C6-C9 mittels Durchflusszytometrie verglichen werden, ob CFHR5 die Lyse der Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz ohne CFHR5 beeinflusst.

Desweiteren sollte untersucht werden, warum der Komplementaktivator CFHR5 mit hoher Intensität an das prozessierte C3- Fragment C3d bindet. Es wurde postuliert, dass CFHR5 an deponiertes C3d bindet und so die Interaktion von C3d mit dem Komplementrezeptor CR2 auf B- Zellen sowie follikulär dendritischen Zellen moduliert. Dieser Ansatz sollte experimentell untersucht werden, beispielsweise indem im ersten Schritt die Interaktion von CFHR5, C3d und CR2 überprüft wird. Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann die Kollokalisierung von CFHR5 und C3d bzw. CFHR5 und CR2 auf den B- Zellen und follikulär dendritischen Zellen analysiert werden.

Die weitere Erforschung des Komplementaktivators CFHR5 ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis, wie bei der C3- Glomerulopathie die CFHR5- Hybridproteine das Komplementsystem betroffener Patienten aus dem Gleichgewicht bringen und ist Schlüssel zur Entwicklung einer zielgerichteten Therapie.

10 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Dissertation zeigt wesentliche neue Daten zum Pathomechanismus der C3- Glomerulopathie und zur Funktion von CFHR5 als Komplementregulator. CFHR5 ist eine bedeutende Komponente in der zielgerichteten, nicht inflammatorischen Beseitigung von modifizierten körpereigenen Zellen und seine Effektorfunktionen gehen weit über die Entdeckung des Komplementsystems als Hitze labiles „Addiment“, welches die Antikörperantwort komplementiert, hinaus.

Für Patienten mit der Diagnose C3- Glomerulopathie gibt es bisher keine effektive Therapie. Es wird versucht den Patienten durch allgemeine Maßnahmen wie Plasmapherese zu helfen. Allerdings ohne die Erkrankung aufzuhalten und ohne längerfristige Erfolge. CFHR5 ist wichtig für die Balance der Komplementaktivatoren und Inhibitoren und somit von großer Bedeutung für die Immunhomöostase. Die CFHR5- Hybridproteine stören diese Balance und verschieben das Gleichgewicht zur Seite der Komplementaktivierung. Ein wichtiger Therapieansatz kann daher in der Inhibition des Komplementsystems, i.e. des Alternativen Weges, dem Hauptangriffspunkt der CFHR5- Hybridproteine bestehen.

Eculizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper und kommerziell verfügbarer Komplementinhibitor, wird derzeit bei der Behandlung des atypischen Hämolytisch-Urämischen Syndroms (aHUS) und der paroxysmalen nächtlichen Hämaturie angewandt. Auch bei Patienten mit der Diagnose C3- Glomerulopathie wurde Eculizumab in der Therapie eingesetzt und einige, jedoch nicht alle Patienten profitierten von dieser zielgerichteten Komplementtherapie (Bomback et al. 2012). Grund für das nur teilweise Anschlagen der Therapie ist unter anderem der Angriffsort von Eculizumab. Der monoklonale Antikörper hemmt die Spaltung von C5 und den Terminalen Komplex und wirkt somit an Komponenten, die der C3- Konvertase und somit dem Hauptaktionsort der CFHR5- Hybridproteine nachgeschaltet sind. Lösliches CR1 und Compstatin sind noch nicht für die Therapie zugelassen und wären durch die Blockade des Komplementsystems auf Ebene von C3 nach ihrer Zulassung eine vielversprechende Therapieoption (Weisman et al. 1990, Mossakowska et al. 1999, Ricklin und Lambris 2008). Bis allerdings eine gerichtete Inhibition der C3- Konvertase zur Verfügung steht, sollte versucht werden auch Patienten mit CFHR5- Hybridproteinen mit Eculizumab zu behandeln, um den Krankheitsverlauf zu verzögern. Eine weitere Herausforderung ist die Klassifizierung der C3- Glomerulopathie. Die C3- Glomerulopathie ist ein heterogenes Krankheitsbild mit vielfältigen Ursachen. Es sollten Biomarker gefunden werden, die eine klare Zuordnung der Patienten ermöglichen und somit zielgerichtete Therapien zulassen.

11 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alchi B, Jayne D. 2010. Membranoproliferative glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol*, 25 (8):1409-1418.
- Alcorlo M, Tortajada A, Rodriguez de Cordoba S, Llorca O. 2013. Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (33):13504-13509.
- Amarilyo G, Verbovetski I, Atallah M, Grau A, Wiser G, Gil O, Ben-Neriah Y, Mevorach D. 2010. iC3b-opsonized apoptotic cells mediate a distinct anti-inflammatory response and transcriptional NF-kappaB-dependent blockade. *Eur J Immunol*, 40 (3):699-709.
- Appel GB, Cook HT, Hageman G, Jennette JC, Kashgarian M, Kirschfink M, Lambris JD, Lanning L, Lutz HU, Meri S, Rose NR, Salant DJ, Sethi S, Smith RJ, Smoyer W, Tully HF, Tully SP, Walker P, Welsh M, Wurzner R, Zipfel PF. 2005. Membranoproliferative glomerulonephritis type II (dense deposit disease): an update. *J Am Soc Nephrol*, 16 (5):1392-1403.
- Barbour TD, Ruseva MM, Pickering MC. 2014. Update on C3 glomerulopathy. *Nephrol Dial Transplant*.
- Bomback AS, Smith RJ, Barile GR, Zhang Y, Heher EC, Herlitz L, Stokes MB, Markowitz GS, D'Agati VD, Canetta PA, Radhakrishnan J, Appel GB. 2012. Eculizumab for dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 7 (5):748-756.
- Carroll MC, Isenman DE. 2012. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*, 37 (2):199-207.
- Chen Q, Manzke M, Hartmann A, Büttner M, Amann K, Pauly D, Wiesener M, Skerka C, Zipfel PF. 2015. CFHR5-Hybrid Proteins Anchor Properdin and Activate Complement at Self-Surfaces. *Journal of the American Society of Nephrology*.
- Chen Q, Wiesener M, Eberhardt HU, Hartmann A, Uzonyi B, Kirschfink M, Amann K, Büttner M, Goodship T, Hugo C, Skerka C, Zipfel PF. 2014. Complement factor H-related hybrid protein deregulates complement in dense deposit disease. *J Clin Invest*, 124 (1):145-155.
- Cole DS, Hughes TR, Gasque P, Morgan BP. 2006. Complement regulator loss on apoptotic neuronal cells causes increased complement activation and promotes both phagocytosis and cell lysis. *Mol Immunol*, 43 (12):1953-1964.
- Cook HT, Pickering MC. 2015. Histopathology of MPGN and C3 glomerulopathies. *Nat Rev Nephrol*, 11 (1):14-22.
- Csincsi AI, Kopp A, Zoldi M, Banlaki Z, Uzonyi B, Hebecker M, Caesar JJ, Pickering MC, Daigo K, Hamakubo T, Lea SM, Goicoechea de Jorge E, Jozsi M. 2015. Factor H-Related Protein 5 Interacts with Pentraxin 3 and the Extracellular Matrix and Modulates Complement Activation. *J Immunol*.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*, 271 (5247):348-350.
- Eberhardt HU, Buhlmann D, Hortschansky P, Chen Q, Böhm S, Kemper MJ, Wallich R, Hartmann A, Hallstrom T, Zipfel PF, Skerka C. 2013. Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS One*, 8 (11):e78617.
- Ehrlich P, Morgenroth J. 1899. Zur Theorie der Lysinwirkung. *Berliner Klinische Wochenschrift*:6-9.
- Fearon DT. 1978. Regulation by membrane sialic acid of beta1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75 (4):1971-1975.
- Fearon DT, Austen KF. 1975. Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med*, 142 (4):856-863.

- Fearon DT, Carter RH. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*, 13:127-149.
- Fishelson Z, Attali G, Mevorach D. 2001. Complement and apoptosis. *Mol Immunol*, 38 (2-3):207-219.
- Flierman R, Daha MR. 2007. The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*, 212 (4-5):363-370.
- Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, Martinez-Barricarte R, Hadjisavvas A, McLean AG, Pusey CD, Pierides A, Kyriacou K, Athanasiou Y, Voskarides K, Deltas C, Palmer A, Fremeaux-Bacchi V, de Cordoba SR, Maxwell PH, Pickering MC. 2010. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet*, 376 (9743):794-801.
- Gasque P. 2004. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, 41 (11):1089-1098.
- Goicoechea de Jorge E, Caesar JJ, Malik TH, Patel M, Colledge M, Johnson S, Hakobyan S, Morgan BP, Harris CL, Pickering MC, Lea SM. 2013. Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (12):4685-4690.
- Gonzalez SF, Degen SE, Pitcher LA, Woodruff M, Heesters BA, Carroll MC. 2011. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. *Annu Rev Immunol*, 29:215-233.
- Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, Gropp K, Enghardt T, Wallich R, Halbich S, Mihlan M, Schlotzer-Schrehardt U, Zipfel PF, Skerka C. 2009. Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood*, 114 (12):2439-2447.
- Hellwage J, Jokiranta TS, Koistinen V, Vaarala O, Meri S, Zipfel PF. 1999. Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett*, 462 (3):345-352.
- Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P. 2006. Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*, 444 (7116):213-216.
- Java A, Liszewski MK, Hourcade DE, Zhang F, Atkinson JP. 2015. Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney. *Mol Immunol*, 67 (2 Pt B):584-595.
- Jozsi M, Zipfel PF. 2008. Factor H family proteins and human diseases. *Trends Immunol*, 29 (8):380-387.
- Jozsi M, Meri S. 2014. Factor H-related proteins. *Methods Mol Biol*, 1100:225-236.
- Kemper C, Atkinson JP, Hourcade DE. 2010. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol*, 28:131-155.
- Kim DD, Song WC. 2006. Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol*, 118 (2-3):127-136.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell D. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16 (1):3-11.
- Leshner AM, Nilsson B, Song WC. 2013. Properdin in complement activation and tissue injury. *Mol Immunol*, 56 (3):191-198.
- Li K, Wu D, Chen X, Zhang T, Zhang L, Yi Y, Miao Z, Jin N, Bi X, Wang H, Xu J, Wang D. 2014. Current and emerging biomarkers of cell death in human disease. *Biomed Res Int*, 2014:690103.

- Licht C, Schlotzer-Schrehardt U, Kirschfink M, Zipfel PF, Hoppe B. 2007. MPGN II--genetically determined by defective complement regulation? *Pediatr Nephrol*, 22 (1):2-9.
- Malik TH, Lavin PJ, Goicoechea de Jorge E, Vernon KA, Rose KL, Patel MP, de Leeuw M, Neary JJ, Conlon PJ, Winn MP, Pickering MC. 2012. A hybrid CFHR3-1 gene causes familial C3 glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*, 23 (7):1155-1160.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182 (5):1545-1556.
- Mathur M, Sharma S, Prasad D, Garsa R, Singh AP, Kumar R, Beniwal P, Agarwal D, Malhotra V. 2015. Incidence and profile of C3 Glomerulopathy: A single center study. *Indian J Nephrol*, 25 (1):8-11.
- McCullough JW, Renner B, Thurman JM. 2013. The role of the complement system in acute kidney injury. *Semin Nephrol*, 33 (6):543-556.
- McRae JL, Cowan PJ, Power DA, Mitchelhill KI, Kemp BE, Morgan BP, Murphy BF. 2001. Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein. *J Biol Chem*, 276 (9):6747-6754.
- McRae JL, Duthy TG, Griggs KM, Ormsby RJ, Cowan PJ, Cromer BA, McKinstry WJ, Parker MW, Murphy BF, Gordon DL. 2005. Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein, and associates with lipoprotein. *J Immunol*, 174 (10):6250-6256.
- Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. 2015a. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*, 6:262.
- Merle NS, Noe R, Halbwachs-Mecarelli L, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. 2015b. Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol*, 6:257.
- Mevorach D, Mascarenhas JO, Gershov D, Elkon KB. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *J Exp Med*, 188 (12):2313-2320.
- Morgan HP, Schmidt CQ, Guariento M, Blaum BS, Gillespie D, Herbert AP, Kavanagh D, Mertens HD, Svergun DI, Johansson CM, Uhrin D, Barlow PN, Hannan JP. 2011. Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol*, 18 (4):463-470.
- Mossakowska D, Dodd I, Pindar W, Smith RA. 1999. Structure-activity relationships within the N-terminal short consensus repeats (SCR) of human CR1 (C3b/C4b receptor, CD35): SCR 3 plays a critical role in inhibition of the classical and alternative pathways of complement activation. *Eur J Immunol*, 29 (6):1955-1965.
- Murphy B, Georgiou T, Machet D, Hill P, McRae J. 2002. Factor H-related protein-5: a novel component of human glomerular immune deposits. *Am J Kidney Dis*, 39 (1):24-27.
- Nangaku M. 1998. Complement regulatory proteins in glomerular diseases. *Kidney Int*, 54 (5):1419-1428.
- Nilsson SC, Sim RB, Lea SM, Fremeaux-Bacchi V, Blom AM. 2011. Complement factor I in health and disease. *Mol Immunol*, 48 (14):1611-1620.
- Pickering MC, D'Agati VD, Nester CM, Smith RJ, Haas M, Appel GB, Alpers CE, Bajema IM, Bedrosian C, Braun M, Doyle M, Fakhouri F, Fervenza FC, Fogo AB, Fremeaux-Bacchi V, Gale DP, Goicoechea de Jorge E, Griffin G, Harris CL, Holers VM, Johnson S, Lavin PJ, Medjeral-Thomas N, Paul Morgan B, Nast CC, Noel LH, Peters DK, Rodriguez de Cordoba S, Servais A, Sethi S, Song WC, Tamburini P, Thurman JM, Zavros M, Cook HT. 2013. C3 glomerulopathy: consensus report. *Kidney Int*, 84 (6):1079-1089.
- Qin D, Wu J, Carroll MC, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. 1998. Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells

- and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. *J Immunol*, 161 (9):4549-4554.
- Rickert RC. 2005. Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr Opin Immunol*, 17 (3):237-243.
- Ricklin D, Lambris JD. 2008. Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application. *Adv Exp Med Biol*, 632:273-292.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. 2010. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*, 11 (9):785-797.
- Rodriguez de Cordoba S, Harris CL, Morgan BP, Llorca O. 2011. Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1812 (1):12-22.
- Rodriguez de Cordoba S, Esparza-Gordillo J, Goicoechea de Jorge E, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, 41 (4):355-367.
- Roosendaal R, Carroll MC. 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*, 219:157-166.
- Ross GD, Vetvicka V. 1993. CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions. *Clin Exp Immunol*, 92 (2):181-184.
- Servais A, Noel LH, Fremeaux-Bacchi V, Lesavre P. 2013. C3 glomerulopathy. *Contrib Nephrol*, 181:185-193.
- Sethi S, Nester CM, Smith RJ. 2012. Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: resolving the confusion. *Kidney Int*, 81 (5):434-441.
- Skerka C, Zipfel PF. 2008. Complement factor H related proteins in immune diseases. *Vaccine*, 26 Suppl 8:I9-14.
- Skerka C, Chen Q, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. 2013. Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol Immunol*, 56 (3):170-180.
- Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today*, 19 (11):519-523.
- Suzuki K, Grigorova I, Phan TG, Kelly LM, Cyster JG. 2009. Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells. *J Exp Med*, 206 (7):1485-1493.
- Tedder TF. 2010. Innate and adaptive receptors interact to balance humoral immunity. *J Immunol*, 184 (5):2231-2232.
- Thurman JM, Renner B. 2011. Dynamic control of the complement system by modulated expression of regulatory proteins. *Lab Invest*, 91 (1):4-11.
- Timmann C, Leippe M, Horstmann RD. 1991. Two major serum components antigenically related to complement factor H are different glycosylation forms of a single protein with no factor H-like complement regulatory functions. *J Immunol*, 146 (4):1265-1270.
- Tortajada A, Yebenes H, Abarrategui-Garrido C, Anter J, Garcia-Fernandez JM, Martinez-Barricarte R, Alba-Dominguez M, Malik TH, Bedoya R, Cabrera Perez R, Lopez Trascasa M, Pickering MC, Harris CL, Sanchez-Corral P, Llorca O, Rodriguez de Cordoba S. 2013. C3 glomerulopathy-associated CFHR1 mutation alters FHR oligomerization and complement regulation. *J Clin Invest*, 123 (6):2434-2446.
- Trouw LA, Blom AM, Gasque P. 2008. Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells. *Mol Immunol*, 45 (5):1199-1207.
- Walport MJ. 2001a. Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344 (14):1058-1066.
- Walport MJ. 2001b. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med*, 344 (15):1140-1144.
- Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Jr., Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT. 1990. Soluble human complement receptor type

- 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, 249 (4965):146-151.
- Xiao X, Pickering MC, Smith RJ. 2014. C3 glomerulopathy: the genetic and clinical findings in dense deposit disease and C3 glomerulonephritis. *Semin Thromb Hemost*, 40 (4):465-471.
- Zhang Y, Xiao X, Garcia-Fernandez JM, Rodriguez de Cordoba S, Zipfel PF, Meyer N, Sethi S, Nester C, Ghossein C, Smith R. 2013. A novel fusion gene CFHR5-CFHR2 causes C3 Glomerulonephritis. *Molecular Immunology*, 56:297.
- Zipfel PF, Skerka C. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol*, 9 (10):729-740.
- Zipfel PF, Heinen S, Jozsi M, Skerka C. 2006. Complement and diseases: defective alternative pathway control results in kidney and eye diseases. *Mol Immunol*, 43 (1-2):97-106.
- Zipfel PF, Jokiranta TS, Hellwage J, Koistinen V, Meri S. 1999. The factor H protein family. *Immunopharmacology*, 42 (1-3):53-60.
- Zipfel PF, Skerka C, Chen Q, Wiech T, Goodship T, Johnson S, Fremeaux-Bacchi V, Nester C, de Cordoba SR, Noris M, Pickering M, Smith R. 2015. The role of complement in C3 glomerulopathy. *Mol Immunol*, 67 (1):21-30.

12 Anhang

12.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Peter F. Zipfel und

Dr. Qian Chen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

12.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

12.2.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Alternative Weg des Komplementsystems und dessen Regulatoren.	3
Abb. 2: Struktur von CFHR5 als Dimer- Komplex.	4
Abb. 3: Chromosomale Anordnung und Struktur der Mitglieder der CFHR- Familie.	5
Abb. 4: Strukturelle Veränderungen im CFHR- Gencluster führen zu Expression von CFHR- Hybridproteinen.	7
Abb. 5: SCR- Struktur von CFHR5.	8
Abb. 6: Homologie von CFHR5, CFHR1 und CFHR2 sowie Faktor H auf Proteinebene.	9
Abb. 7: Struktur und berechnete molekulare Masse von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten.	22
Abb. 8: Expressionsvektor cDNA TM 4/TO/myc-His B.	23
Abb. 9: Detektion von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten durch mAk- hc- Myc und mAk- CFHR5.	24
Abb. 10: Darstellung von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten im Silbergel und im Western Blot.	26
Abb. 11: Bindung von CFHR5 an CHO Zellen.	27
Abb. 12: Bindung von CFHR5 an HUVEC.	28
Abb. 13: CFHR5 bindet an intakte, früh- und spätapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Western Blot.	29
Abb. 14: CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie.	30
Abb. 15: Bindung von CFHR5 an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie.	32
Abb. 16: Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5 ₃₋₇ und CFHR5 ₃₋₉ binden an CHO Zellen.	33
Abb. 17: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an intakte, früh- und spätapoptotische sowie nekrotische HUVEC, Western Blot.	35
Abb. 18: Bindung von CFHR5, CFHR5 ₃₋₇ , CFHR5 ₃₋₉ und CFHR5 _{8,9} an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Durchflusszytometrie.	37
Abb. 19: Die CFHR5 Deletionsmutanten binden an nekrotische HUVEC, Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie.	39
Abb. 20: Bindung von CFHR5 und den CFHR5 Deletionsmutanten an Heparin.	40
Abb. 21: CFHR5 bindet C3- Aktivierungsfragmente.	41
Abb. 22: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an C3- Aktivierungsfragmente.	42

Abb. 23: CFHR5 bindet Properdin.....	43
Abb. 24: Bindung der CFHR5 Deletionsmutanten an Properdin.....	44
Abb. 25: Domänenstruktur von CFHR5 und Funktion der Domänen.	49
Abb. 26: CFHR5 aktiviert Komplement auf modifizierten körpereigenen Oberflächen.	50
Abb. 27: CFHR5 bindet die C3- Aktivierungsfragmente mit unterschiedlicher Intensität.....	52
Abb. 28: CFHR5, Properdin und C3- Aktivierungsfragmente interagieren miteinander.	54
Abb. 29: Komplementaktivität von CFHR5 und dem Hybridprotein CFHR2 _{1,2} - CFHR5	55

12.2.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CFHR5 bindet an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC.....	31
Tabelle 2: Die CFHR5 Deletionsmutanten CFHR5 ₃₋₇ und CFHR5 ₃₋₉ binden an CHO Zellen.	33
Tabelle 3: Bindung von CFHR5, CFHR5 ₃₋₇ , CFHR5 ₃₋₉ und CFHR5 _{8,9} an intakte, frühapoptotische und nekrotische HUVEC.	37
Tabelle 4: CFHR5 bindet an zelluläre Oberflächen: Lokalisation der CFHR5 Oberflächenbindedomäne.....	46
Tabelle 5: Lokalisation der Ligandeninteraktionsdomäne von CFHR5.....	48

12.3 Danksagung

Vielen Dank an die Abteilung der Infektionsbiologie des Hans- Knöll- Institutes Jena! Ich danke Nadine Flach und im Besonderen Andrea Hartmann für ihre Unterstützung beim Erlernen der Labormethoden. Ich danke Dr. Hans- Martin Dahse für die Bereitstellung der Zellen und die Einführung in das Arbeiten mit Zellkulturen. Ein Dankschön möchte ich Dr. Qian Chen aussprechen für ihre Betreuung während meiner gesamten Laborarbeit und darüber hinaus für zahlreiche Gespräche rund um das Komplementsystem. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter F. Zipfel für die Gelegenheit ein so hochinteressantes wie aktuelles Thema bearbeiten zu dürfen. Ich habe in meiner Zeit am Hans- Knöll- Institut viel über wissenschaftliches Arbeiten und die Abläufe im Labor gelernt und freue mich über dieses Wissen für meinen späteren Arztberuf.

Herzlichen Dank Herr Prof. Dr. Peter F. Zipfel für eine Betreuung, die ich mir besser nicht vorstellen kann.

Vielen Dank!